

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/KR05/000784

International filing date: 18 March 2005 (18.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: KR
Number: 10-2004-0018551
Filing date: 18 March 2004 (18.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 20 June 2005 (20.06.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



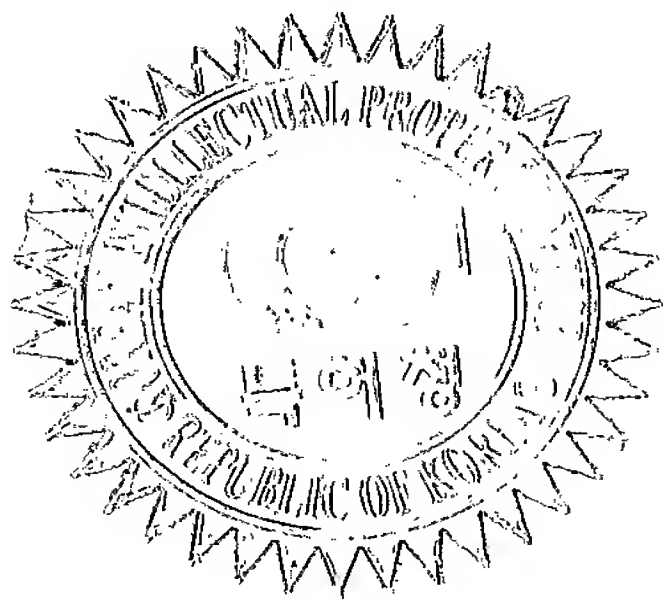
별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원 번호 : 10-2004-0018551
Application Number

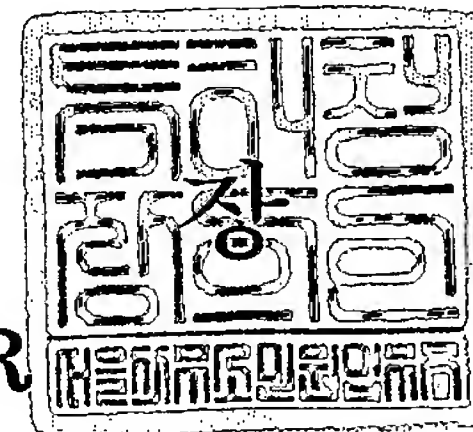
출원 년 월 일 : 2004년 03월 18일
Date of Application MAR 18, 2004

출원인 : (주)에스제이바이오메드
Applicant(s) SJ BIOMED INC., KOREA



2005 년 03 월 23 일

특 허 청
COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】 특허출원서
【권리구분】 특허
【수신처】 특허청장
【제출일자】 2004.03.18
【발명의 국문명칭】 항비만용 면역원성 하이브리드 폴리펩타이드 및 이를 포함하는 항비만 백신 조성물
【발명의 영문명칭】 Anti-obese immuogenic hybrid polypeptides and anti-obese vaccine composition comprising the same
【출원인】
【명칭】 (주)에스제이바이오메드
【출원인코드】 1-2001-033954-7
【대리인】
【성명】 손민
【대리인코드】 9-1999-000420-6
【포괄위임등록번호】 2003-062574-6
【발명자】
【성명】 김효준
【출원인코드】 4-2000-005140-4
【심사청구】 청구
【미생물기탁】
【기탁기관명】 KCCM
【수탁번호】 KCCM-10562
【수탁일자】 2004.03.04
【핵산염기 및 아미노산 서열목록】
【서열개수】 9
【서열목록의 전자문서】 첨부

【취지】	특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사 를 청구합니다. 대리인 손민 (인)		
【수수료】			
【기본출원료】	53 면	38,000 원	
【가산출원료】	0 면	0 원	
【우선권주장료】	0 건	0 원	
【심사청구료】	15 항	589,000 원	
【합계】	627,000 원	.	
【감면사유】	소기업(70%감면)		
【감면후 수수료】	188,100 원		
【첨부서류】	1.미생물기탁증명서_1통 2.소기업임을 증명하는 서류[사업자등록증 사본, 원천징수이행상황신 고서 사본]_1통		

【요약서】**【요약】**

본 발명은 아포지단백질 B-100(Apolipoprotein B-100)의 B 세포 에피토프의 모조 펩타이드와 헬퍼 T 세포 에피토프를 포함하고 상기 모조 펩타이드의 C-말단이 헬퍼 T 세포 에피토프의 N-말단과 융합된 면역원 하이브리드 폴리펩타이드 및 이를 포함하는 비만 예방 또는 치료용 백신 조성물에 관한 것이다.

【대표도】

도 12

【색인어】

아포지단백질 B-100, B 세포 에피토프, 헬퍼 T 세포 에피토프, preS2, 비만

【명세서】

【발명의 명칭】

항비만용 면역원성 하이브리드 폴리펩타이드 및 이를 포함하는 항비만 백신
 조성물{Anti-obese immuogenic hybrid polypeptides and anti-obese vaccine
 composition comprising the same}

【도면의 간단한 설명】

- <1> 도 1은 pB1₄T 제작도를 나타낸다.
- <2> 도 2는 pB1₄T의 제한효소 절단을 나타낸다.
- <3> 도 3은 DNA 서열에서 유추한 PB1₄T의 일차 구조를 나타낸다.
- <4> 도 4는 형질전환된 에셰리키아 콜라이(*Escherichia coli*) M15/pB1₄T를 IPTG로 PB1₄T의 발현을 유도한 후 SDS-PAGE 분석한 결과이다. 발현된 재조합 PB1₄T는 화살표로 표시하였다. 라인 M: 미리 염색된(prestained) 단백질 크기 마커; 라인 1: IPTG-유도되지 않은 이. 콜라이 M15; 라인 3에서 7: IPTG-유도 1, 2, 3, 4 및 5 시간 후의 이. 콜라이 M15/pB1₄T.
- <5> 도 5는 형질전환된 에셰리키아 콜라이(*Escherichia coli*) M15/pB1₈을 IPTG로 PB1₈의 발현을 유도한 후 SDS-PAGE 분석한 결과이다. 발현된 재조합 PB1₈은 화살표

로 표시하였다. 라인 M: 미리 염색된 단백질 크기 마커; 라인 1: IPTG-유도되지 않은 이. 콜라이 M15; 라인 2에서 : IPTG 유도 1, 2, 3 및 4 시간후의 이. 콜라이 M15/pB1₈.

<6> 도 6은 이. 콜라이 용해물(lysate)의 SDS-PAGE 분석 결과이다. 박테리아 용해물을 원심분리하여 상층액과 침전물로 분리한 뒤 상층액(라인 1)과 침전물(라인 2)을 SDS-PAGE 분석하였다. PB1₄T는 화살표로 표시한 것처럼 침전물에서 나타났다.

<7> 도 7은 이. 콜라이 용해물의 SDS-PAGE 분석 결과이다. 박테리아 용해물을 원심분리하여 상층액과 침전물로 분리한 뒤 전체 용해물(라인 1), 상층액(라인 2)과 침전물(라인 3)을 SDS-PAGE 분석하였다. PB1₈은 화살표로 표시한 것처럼 침전물에 나타났다.

<8> 도 8은 정제한 PB1₄T 펩타이드를 웨스턴 블랏 분석한 결과이다. 항 PB1₄ 래빗 항체(A)와 항 preS2 단클론 항체(B)를 이용하여 PB1₄T를 분석하였다. 라인 1: 이. 콜라이 M15; 라인 2: IPTG-유도되지 않은 이. 콜라이 M15/pB1₄T; 라인 3: IPTG-유도 3시간 후의 이. 콜라이 M15/pB1₄T.

<9> 도 9는 이미다졸 선형 농도 구배에 따른 Ni-NTA 친화성 크로마토그래피의 PB1₄ 용출 프로파일을 나타낸다.

<10> 도 10은 이미다졸 선형 농도 구배에 따른 Ni-NTA 친화성 크로마토그래피의

PB1₄T 용출 프로파일을 나타낸다.

<11> 도 11은 이미다졸의 선형 농도 구배에 따른 Ni-NTA 친화성 크로마토그래피의 PB1₈ 용출 프로파일을 나타낸다.

<12> 도 12는 SD계 환쥐에서 대조군(normal), 모의군(mock), 백신처리군에서 체중 증가를 비교한 그래프를 나타낸다. 대조군(정사각형)은 PBS로 주사되었고 모의군(삼각형)은 오브알부민으로 주사되었다. 백신처리군은 PB1₄를 매체 단백질 OVA와 포합시킨 PB1₄+OVA(마름모꼴) 펩타이드와 PB1₄T(원형) 펩타이드로 주사되었다. 이런 펩타이드 주사는 2주 간격으로 3번씩 실시되었다. 화살표는 백신처리하는 시점을 나타낸다.

<13> 도 13은 항-PB1₄와 항-PB1₄T의 항체 역가 변화를 측정한 결과이다.

<14> 도 14는 혈청내 트리글리세라이드, HDL, LDL, 총 콜레스테롤 양을 측정한 결과이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<15> 본 발명은 아포지단백질 B-100의 B 세포 에피토프의 모조 펩타이드와 헬퍼 T 세포 에피토프를 포함하고 상기 모조 펩타이드의 C-말단이 헬퍼 T 세포 에피토프

부분의 N-말단과 융합된 면역원 하이브리드 폴리펩타이드 및 이를 포함하는 비만 예방 또는 치료용 백신 조성물에 관한 것이다.

<16>

최근 우리나라에서는 서구적 식생활의 영향으로 동맥경화증 및 관상동맥질환 (coronary atherosclerotic disease: CAD)이 점차적으로 증가추세에 있으며, 이로 인한 사망률이 높아져 가고 있다. 이러한 질환의 원인이 되는 혈청 지질로는 콜레스테롤(cholesterol), 트리글리세라이드(triglyceride: TG), 유리 지방산(free fatty acid), 포스포리피드(phospholipid) 등이 있으며, 아포지단백질 (apolipoprotein)과 함께 지단백질(lipoprotein)을 형성하여 혈액순환을 통해 운반되고 있다. 그중에서 LDL(low density lipoprotein)는 주로 TG, 콜레스테롤의 운반을 담당하고 있으며 LDL-콜레스테롤 수치의 변화는 위와 같은 질병의 예후를 나타내는 척도가 된다.

<17>

지질 대사와 관련된 성인병의 주요 인자인 LDL-콜레스테롤은 각 조직의 세포막의 LDL 수용체에 결합하여 조직내에 저장, 활용되거나 청소세포(스카벤저 탐식세포)에 포획되어진 후 가수분해되어 유리 콜레스테롤 형태로 아포 E지단백질과 함께 HDL로 전달되어 간에서 재활용되거나 담즙산 형태로 처리되어 배설되는 경로가 밝혀져 있다. 이 과정에서 아포지단백질은 지단백의 구조적 항상성을 유지하고, 지방질 분해효소의 보조인자기능 및 세포막상의 특정 수용체와 결합하는 매우 중요한 기능을 수행하고 있다.

<18>

아포지단백질 B-100(Apolipoprotein B-100: Apo B-100)은 이러한 저밀도 지단백질(LDL)의 주된 단백질 성분이며 또한 IDL, VLDL, 카일로마이크론

(chylomicron)에 존재하고 있기 때문에, 혈중에 있는 항체가 Apo B-100을 인식하도록 유도한다면 식세포에 의한 LDL-소거(clearance)가 용이하게 일어날 수 있을 것이다. 이와 같은 근거로 최근 백신을 이용하여 LDL-콜레스테롤의 수치를 낮추고 동맥경화를 감소시키기 위한 연구가 시도되고 있다. 이와 같은 항-콜레스테롤 백신 요법에 의해 유도된 항체는 IgM 타입으로 VLDL, IDL 및 LDL과 결합하는 것으로 보여지며 이것을 통해서 고콜레스테롤 및 아테롬성 동맥경화증에 대한 예방 및 치료용 백신의 가능성이 제시되고 있다(Bailey, et al., *Cholesterol vaccines. Science* 264, 1067-1068, 1994; Palinski W et al., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92, 821-5, 1995; Wu R. de Faire U et al., *Hypertension.* 33, 53-9, 1999). 또한, 아포지단백질 B-100은 4560개의 아미노산 잔기(24개의 시그널 펩타이드를 포함하여)로 구성된 거대한 단백질 분자로 분자량은 500 kDa을 초과한다(Elovson J et al., *Biochemistry*, 24: 1569-1578, 1985). 주로 간에서 분비되고 양친매성을 가지는 분자이기 때문에 지단백질의 리피드와 상호작용 할 수도 있고 수용액의 환경과도 상호작용이 가능하다(Segrest J. P et al., *Adv. Protein Chem.*, 45: 303-369, 1994). 아포지단백질 B-100은 LDL 입자의 크기와 구조를 안정화 시키는 역할과 수용기와 결합을 통하여 혈장내 LDL 콜레스테롤의 항상성을 조절하는데 중요한 역할을 한다(Brown MS et al., *Science*, 232 : 34-47, 1986).

<19>

본원의 발명자에 의해 출원된 한국 특허 공개번호 제2002-0018971호는 Apo B-100의 에피토프에 대한 모조 펩타이드(mimetic peptide)가 항비만 효과를 갖는다고 기술하고 있다. 그러나, 상기 출원에서는 단지 상기한 B 세포의 에피토프인 모

조 펩타이드가 항비만 효과를 보인다는 것을 단순 개시하고 있다.

<20> 본 발명 이전에는 아포지단백질의 B 세포 에피토프와 T 세포 에피토프를 융합시켜 면역원성을 증강시키고자 시도한 바 없었으며, 단지 면역 반응을 증강시키기 위해 단백질 캐리어 또는 보조제로 사용한 시도가 있었을 뿐이었다.

<21> 미국 특허 제5,843,446호에서는 LHRH의 면역원성을 증강시키기 위해 LHRH에 이와 다른 단백질을 결합시킬 수 있으나 이 경우 주요 면역반응이 LHRH에 대해서 유도되기 보다는 결합된 캐리어 단백질에 대해 유도되어 오히려 LHRH에 대한 면역억제가 유도될 수 있다는 문제에 대해 기술하고 있으며, 이로부터 알 수 있는 바와 같이, B 세포 에피토프의 면역원성을 증강시키기 위한 추가 물질의 선별, 결합 방식, 결합 위치 등에 대한 연구개발은 꾸준한 노력이 필요하다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<22> 합텐의 면역원성을 높이기 위하여 매체 단백질과 융합시키는 시도가 많이 있었지만 일률적인 상승효과를 얻을 수는 없었다. 특히 본 발명과 같은 B 세포 에피토프와 T 세포 에피토프의 선형 연결시 이들의 방향성, 각각의 에피토프의 종류 등에 의해 오히려 면역원성이 소실되는 경우도 있었으며(Francis, M. J. et al., *Nature* 330: 168-170, 1987) 링커의 존재로 인하여 항원성이 감소하는 경우도 발생하였다(Partidos, C. et al., *Mol. Immunol.* 29:651-658, 1992). 이와 같이 펩타이드 백신 디자인에 일관적으로 적용할 수 있는 양태가 존재하지 않으며 디자인된

백신의 효능 또한 예측할 수 없다. 동일한 이유로 소수성이 매우 강한 PB1₄ 펩타이드를 이중 펩타이드인 T 세포 에피토프와 융합시킬 경우 오히려 항원성을 나타내는 부위를 분자 내부로 몰입시켜 항체 유도능이 저하될 가능성도 배제할 수 없다.

<23> 이러한 배경하에서, 본 발명자는 항비만 효과를 나타내는 아포지단백질 B-100의 B 세포 에피토프의 모조 펩타이드인 PB1₄을 증강시키기 위해 다양한 시도를 하였으며, 그 결과 모조 에피토프의 C-말단에 헬퍼 T 세포의 에피토프의 N-말단을 융합시킨 하이브리드 폴리펩타이드가 우수한 면역증강 효과를 나타내어 비만의 예방 또는 치료에 효과적으로 사용될 수 있음을 확인하였다. 이와 같은 하이브리드 폴리펩타이드가 아포지단백질의 B 세포 에피토프의 유리한 활성 또는 효과를 중화시키는 면역반응을 유도하거나 유해한 부작용을 일으키지 않으면서 우수한 항비만 활성을 나타낼 수 있다는 것은 전혀 유추할 수 없는 효과였다.

<24> 발명의 요지

<25> 하나의 양태로서, 본 발명은 아포지단백질 B-100의 B 세포 에피토프의 모조 펩타이드의 아미노산 서열을 포함하고 상기 모조 펩타이드의 C-말단이 헬퍼 T 세포 에피토프의 N-말단과 융합된 면역원성 하이브리드 폴리펩타이드를 제공한다.

<26> 또 다른 양태에서, 본 발명은 아포지단백질 B-100의 B 세포 에피토프의 모조 펩타이드의 아미노산 서열을 포함하고 상기 모조 펩타이드의 C-말단이 헬퍼 T 세포 에피토프의 N-말단과 융합된 면역원성 하이브리드 폴리펩타이드를 포함하는 비만

예방 또는 치료용 백신을 제공한다.

- <27> 또 다른 양태에서, 본 발명은 상기한 면역원성 하이브리드 폴리펩타이드를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터, 상기한 재조합 벡터를 포함하는 형질전환체, 및 상기한 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포를 배양하여 상기한 하이브리드 폴리펩타이드를 생산하는 방법을 제공한다.

【발명의 구성】

- <28> 하나의 양태로서, 본 발명은 아포지단백질 B-100의 B 세포 에피토프의 모조 펩타이드의 아미노산 서열을 포함하며 상기 모조 펩타이드의 C-말단과 헬퍼 T 세포의 에피토프의 N-말단이 융합된 면역원성 하이브리드 폴리펩타이드에 관한 것이다.
- <29> 본 발명은 아포지단백질에 대한 면역원성을 강화시키기 위한 한 방법으로 아포지단백질, 특히 아포지단백질 B-100의 B 세포 에피토프의 모조 펩타이드에 T 세포 에피토프가 융합된 형태의 면역원성 하이브리드 폴리펩타이드를 제공하는데 의의가 있다. 이와 같이, 아포지단백질 B-100의 B 세포 에피토프의 모조 펩타이드에 T 세포 에피토프가 연결한 결과, 항체 유도능이 강화되었으며 백신 효능 기간이 연장되어 우수한 항비만 효과를 나타내었다.
- <30> 본 발명에서 사용되는 용어 "에피토프의 모조 펩타이드(mimetic peptide)"는 에피토프의 최소 부분을 모방하는 펩타이드로, 항체에 의해 인식될 수 있도록 천연 에피토프와 충분히 유사하거나 천연 에피토프와 교차 반응하는 항체를 증가

시킬 수 있는 에피토프를 의미하며, 달리는 미모토프(mimotope)라고도 한다. 이러한 모조 펩타이드는 생체내에서 비자기(non-self)로 인지된다는 잇점이 있고 그럴 경우 면역반응에서 자기 내성(self tolerance)의 문제를 극복할 수 있다는 장점이 있다. 상기한 아포지단백질 B-100의 B 세포 에피토프의 모조 펩타이드는 아포지단백질 B-100과 특이적으로 결합하는 항체에 의해 인식되며, 아포지단백질 B-100과 특이적으로 결합하는 항체는 아포지단백 B-100을 특이적으로 인식하여 결합하는 다클론 항체와 단클론 항체를 포함하여 이들의 단편, 예를 들어 Fc, Fab, F(ab')₂ 등도 포함한다. 이중 단클론 항체가 바람직하게 사용될 수 있으며, 보다 바람직하게는 mAB B9 및 B23이 사용된다.

<31> 본 발명에서 아포지단백질 B-100의 에피토프의 모조 펩타이드는 서열번호 1, 2 및 3중에서 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 따라서, 바람직한 양태에서, 본 발명은 서열번호 1, 2 및 3중에서 선택된 아미노산 서열을 포함하고 아포지단백질 B-100과 특이적으로 결합하는 항체에 의해 인식되는 펩타이드의 C-말단과 헬퍼 T 세포의 에피토프의 N-말단이 융합된 면역원성 하이브리드 폴리펩타이드에 관한 것이다.

<32> 본 발명자는 파아지 디스플레이드 펩타이드 라이브러리(phage displayed peptide library)로부터 바이오패닝(biopanning)에 의해 아포지단백질 B-100에 대한 단클론 항체 Mab B9 또는 Mab B23에 의해 인식될 수 있는 모조 펩타이드(서열번호 1, 2 및 3)를 밝혀내었다.

<33> 상기한 서열번호 1, 2 및 3중에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 아포지

반응을 강화하는 한 특정한 것으로 한정되지 않으며 목적에 적합한 다양한 단백질, 펩타이드 등이 사용가능하다. 본 발명의 목적상, T 세포 에피토프는 헬퍼 T 세포 에피토프가 바람직하게 사용된다. 예를 들어, B형 간염 표면 항원 헬퍼 T 세포 에피토프, 클라미디아 트라코미티스(*Chlamydia trachomatis*) 주요 외막 단백질 헬퍼 T 세포 에피토프, 플라스모디움 팔시파룸 서큘스포르조이트(*Plasmodium falciparum* circumsporozoite) 헬퍼 T 세포 에피토프, 에셰리키아 콜라이(*Escherichia coli*) TraT 헬퍼 T 세포 에피토프, 테타누스 독소이드(*Tetanus toxoid*) 헬퍼 T 세포 에피토프, 디프테리아 독소이드(*diphtheria toxoid*) 헬퍼 T 세포 에피토프, 쉬스토소마 만소니(*Schistosoma mansoni*) 트리오스 포스페이트 이소머라제 헬퍼 T 세포 에피토프, 홍역(measles) 바이러스 F 단백질 헬퍼 T 세포 에피토프, 백일해 백신(*pertussis vaccine*), BCG(*Bacille Calmette-Guerin*), 폴리오 백신(*polio vaccine*), 유행성 이하선염 백신(*mumps vaccine*), 풍진 백신(*rubella vaccine*), 광견병 백신(*rabies vaccine*), 투베르쿨린의 정제된 단백질 유도체, 키홀 림펫 헤모시아닌(*keyhole limpet hemocyanin*), 이들의 단편 또는 배합물 등으로부터 유래한 T 세포 에피토프 서열을 포함할 수 있다. 상기한 T 세포 에피토프는 특정 목적에 따라 선택된 아미노산 잔기를 첨가, 결실, 치환하여 사용할 수 있으며, 또한 둘 이상의 상기한 T 세포 에피토프가 결합되어 있는 형태의 다량체 형태의 T 세포 에피토프도 제공될 수 있다. 본 발명의 구체예에서는 B형 간염 바이러스의 표면 항원을 사용하였다. B형 간염 바이러스(HBV) 유전자의 크기는 3.2 kb로서, 크게 네가지의 중요한 단백질에 대한 정보를 가지고 있으며, S 유전자(표면항원 단백질), C 유전자

단백질 B-100의 에피토프의 모조 펩타이드는 상기한 서열번호의 아미노산 서열 1개로 이루어진 단량체 형태일 수도 있으나 면역원성을 더욱 증강시키기 위해 상기한 서열번호의 아미노산 서열이 2개 이상, 바람직하게는 3개 내지 8개, 보다 바람직하게는 3개 내지 6개가 연결된 다량체 형태를 취할 수 있다. 가장 바람직하게는 4개가 연결된 사량체(서열번호 4)이다. 다량체의 형태를 취하는 경우, 단량체를 형성하는 아미노산 서열은 직접적으로나 또는 링커를 통해 공유결합으로 연결될 수 있다. 링커를 통해 연결되는 경우 아미노산 예를 들어, 글리신, 알라닌, 발린, 루이신, 이소루이신, 프롤린, 세린, 트레오닌, 아스파라긴, 아스팔트산, 시스테인, 글루타민, 글루탐산, 리신, 아르기닌산을 1개 내지 5개씩 사용하여 연결시킬 수 있으며 사용될 수 있는 바람직한 아미노산으로는 발린, 루이신, 아스팔트산, 글리신, 알라닌, 프롤린을 예시할 수 있다. 보다 바람직하게는 유전자 조작의 용이성을 고려하여 발린, 루이신, 아스팔트산등 중에서 선택된 2개의 아미노산을 연결하여 사용할 수 있다. 바람직하게는, 상기한 서열번호 1, 2 및 3중에서 선택된 아미노산 서열이 상기한 링커를 통해 2개 이상 연결된 모조 펩타이드가 사용된다.

<34>

본 발명에서 “T 세포 에피토프”라는 용어는 적당한 효율로 MHC 클래스II 분자에 결합할 수 있고 T 세포를 자극하거나 또한 MHC 클래스II와 복합체로 T 세포와 결합할 수 있는 아미노산 서열을 의미한다. 그럴 경우 T 세포 에피토프는 T 세포 상에 존재하는 특정 수용체에 의해 인식되고 B 세포가 항체 생산 세포로 분화하는데 요구하는 신호를 제공하는 역할도 하고 세포 독성 T 세포(CTL)을 유도하여 표적 세포의 용균을 유도하기도 한다. T 세포 에피토프는 T 세포를 자극시키고 면역

(코어 단백질), P 유전자(DNA 중합효소) 및 X 유전자로 구성되어 있다. 이중 S 유전자의 경우 HBsAg을 코딩하고 있는 S 영역과 preS 영역으로 나눌 수 있다. preS 영역은 HBV의 균주에 따라서 108 또는 119개의 아미노산을 코딩하고 있는 preS1과 서브타입에 관계없이 55개의 아미노산 잔기로 이루어진 preS2로 나누어진다. HBV preS2 단백질은 체내 면역반응과정에서 헬퍼 T 세포를 활성화시키며 이것은 HBV에 대한 항체 형성을 촉진시킬 수 있다.

<35>

본 발명에서 사용된 용어 "하이브리드 폴리펩타이드"는 일반적으로 기원이 다른 이중 펩타이드가 연결된 형태의 펩타이드를 일컬으며, 본 발명에서는 B 세포 에피토프와 T 세포 에피토프를 연결한 형태의 펩타이드를 의미한다. 이러한 하이브리드 폴리펩타이드는 각각의 파트너가 결정된 후 화학적으로 합성하거나 달리는 유전자 재조합 방법으로 발현 및 정제하여 수득할 수 있다. 바람직하게는, B 세포 에피토프를 코딩하는 유전자 서열과 T 세포 에피토프를 코딩하는 유전자 서열을 연결한 하이브리드 유전자를 세포 발현 시스템에서 발현시켜서 제공된다. 이러한 하이브리드 폴리펩타이드는 B 세포 에피토프와 T 세포 에피토프가 직접 연결되거나 링커와 같은 연결자를 통해 연결될 수 있다. 링커를 통해 연결되는 경우 이에 의한 면역반응 유도에 불리한 영향을 끼치지 않도록 선정되어야 한다.

<36>

본 발명에서 사용된 용어, "폴리펩타이드"는 2개 이상의 아미노산을 포함하는 잔기가 공유 펩타이드 결합에 의해 결합된 모든 길이의 아미노산 쇄를 포함하는 용어로서 디펩타이드, 트리펩타이드, 올리고펩타이드, 폴리펩타이드 등이 이에 포함되며, 특히 본 발명에서는 수개 내지 수십개의 아미노산이 공유 결합된 펩타이드

2종 이상이 서로 연결된 하이브리드 폴리펩타이드를 의미한다. 본 발명의 하이브리드 폴리펩타이드는 2종 이상의 펩타이드, 예를 들어 B 세포 에피토프와 T 세포 에피토프가 연결된 폴리펩타이드이다. 폴리펩타이드를 구성하는 각각의 펩타이드 서열은 상기한 바와 같은 에피토프에 해당하는 서열을 포함하여 그에 인접하게 배치된 서열도 함께 포함할 수 있다. 이들 펩타이드는 L-아미노산, D-아미노산, 또는 두가지 상이한 배치의 아미노산의 다양한 조합을 취할 수 있다. 본 발명의 하이브리드 폴리펩타이드는 전적으로 상기한 바와 같은 B 세포 에피토프, T 세포 에피토프 및 임의로 이의 인접 서열을 포함한 항원성 부분으로만 이루어질 수도 있으며 부가 서열도 포함할 수 있다. 그러나, 이런 부가 서열은 전체 면역원성 (immunogenicity)을 감소시키지 않는 것이 바람직하다. 이러한 부가 서열로는 링커 서열을 예로 들 수 있다.

<37>

본 발명에서 사용된 용어 “면역원성”이란 세포성 면역 및 체액성 면역 면역 반응 모두를 유도하여 이물질에 대해 대처하는 능력을 말하며, 이러한 면역반응을 유도하는 물질을 면역원이라 한다. 본 발명은 면역원성 물질로서 B 세포 에피토프와 T 세포 에피토프 모두를 갖는 폴리펩타이드를 사용한다.

<38>

본 발명자는 B 세포 에피토프를 가지고 있지만 이 자체로는 T 세포 에피토프 부분이 결여되어 있는 항비만 기능적 펩타이드인 Apo B-100 모조 펩타이드의 4량체 형태인 PB1₄의 C 말단 부분과 T 세포 에피토프를 가지고 있는 HBV의 preS2 유전자의 일부(T 단편)를 연결하여 B1₄T 유전자 단편을 제작하였다(도 1). PB1₄ 단편을 얻기

위해서 BamH I 과 Xho I 을, T 단편을 얻기 위해서 Sal I 과 HindIII를 이용하였으며, PB1₄T의 유전자 단편 벡터 pQE30와 결합하여 이. 콜라이 JM109에 형질전환하였다.

제한효소 절단(도 2)과 DNA 서열분석(도 3)을 통해 T 세포 에피토프와 B 세포 에피토프 부분이 연결되어 있는 올바른 클론임을 확인하고 이 클론을 pB1₄T라 명명하였다. PB1₄T 및 PB1₈의 발현을 위해 pQE30 벡터를 사용하였는데 벡터 자체 내에 있는 시작 코돈으로부터 단백질 발현이 시작되고 정제를 편리하게 하기 위한 6개의 히스티딘도 같이 발현되며 엔테로키나아제(enterokinase) 부위도 발현된다. 이렇게 발현되는 단백질의 크기는 PB1₄T는 16.2 kDa이며 PB1₈는 16.5 kDa 였다. 시간대 별로 샘플을 얻어 SDS-PAGE를 통해서 발현이 되는 것을 확인하였다(도 4, 도 5).

<39>

따라서, 본 발명의 구체적인 실시 양태에 따라 4량체 형태의 아포지단백질 B-100의 모조 펩타이드와 B형 간염 바이러스의 표면 항원 preS2가 연결된 서열번호 9의 면역원성 하이브리드 폴리펩타이드가 제공될 수 있다.

<40>

본 발명의 면역원성 하이브리드 폴리펩타이드는 화학적으로 합성하거나 유전자 재조합 방법을 통해 생산할 수 있으며, 바람직하게는 재조합 벡터를 이용하여 이를 숙주 세포에 형질전환시켜 이로부터 발현된 폴리펩타이드를 분리, 정제하여 생산할 수 있다.

<41>

따라서, 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기한 면역원성 하이브리드 폴리펩타이드를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터, 및 상기한 재조합 벡터로 형질전

환된 숙주 세포를 제공한다.

<42> 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기한 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포를 배양하여 제1항의 폴리펩타이드를 생산하는 방법을 제공한다.

<43> 유전자 재조합 방법으로 본 발명의 면역원성 하이브리드 폴리펩타이드를 생산하는 과정을 다음 단계를 포함한다:

<44> 첫째, 하이브리드 펩타이드를 코딩하는 유전자를 벡터에 삽입하여 재조합 벡터를 제조하는 단계이다. 외래 유전자를 삽입하기 위한 벡터로는 플라스미드, 바이러스, 코즈미드 등 다양한 형태의 벡터를 사용할 수 있다. 재조합 벡터는 클로닝 벡터 및 발현 벡터를 포함한다. 클로닝 벡터는 복제기점, 예를 들어 플라스미드, 파지 또는 코즈미드의 복제 기점을 포함하며, 다른 DNA 절편이 부착되어 부착된 절편이 복제될 수 있는 '레플리콘'이다. 발현 벡터는 단백질을 합성하는데 사용되도록 개발되었다. 재조합 벡터는 통상 외래 DNA의 단편이 삽입된 캐리어로서 일반적으로 이중 가닥의 DNA의 단편을 의미한다. 본원에서 "외래 DNA"란 외래 종으로부터 기원되는 DNA를 의미하거나, 동일한 종으로부터 기원되는 경우에는 본래의 형태로부터 실질적으로 변형된 형태를 의미한다. 또한, 세포에서 정상적으로 발현되지 않는 비변화된 DNA 서열도 포함한다. 이 경우 외래 유전자는 전사될 특정 목적 핵산으로 폴리펩타이드를 암호한다. 재조합 벡터는 숙주 세포에서 형질감염 유전자의 발현 수준을 높이기 위해서는 해당 유전자가 선택된 발현 숙주 내에서 기능을 발휘하는 전사 및 해독 발현 조절 서열에 작동 가능하도록 연결되어야만 한다. 상기 재조합 벡터는 개체의 세포 내에서 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가

능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물로서, 이러한 유전자 작제물을 제조하기 위해 표준 재조합 DNA 기술을 이용할 수 있다. 재조합 벡터의 종류는 원핵세포 및 진핵세포의 각종 숙주세포에서 목적하는 유전자를 발현하고, 목적하는 단백질을 생산하는 기능을 하면 특별히 한정되지 않지만, 강력한 활성을 나타내는 프로모터와 강한 발현력을 보유하면서 자연 상태와 유사한 형태의 외래 단백질을 대량으로 생산할 수 있는 벡터가 바람직하다. 재조합 벡터는 적어도, 프로모터, 개시코돈, 목적하는 단백질을 암호화하는 유전자, 종결코돈 터미네이터를 포함하고 있는 것이 바람직하다. 그외에 시그널 펩타이드를 코드하는 DNA, 인핸서 서열, 목적하는 유전자의 5' 측 및 3' 측의 비해독영역, 선별 마커 영역, 또는 복제가능단위 등을 적절하게 포함할 수도 있다.

<45>

둘째, 상기 재조합 벡터를 사용해서 숙주세포를 형질전환 시킨 후 배양하는 단계이다. 재조합 벡터를 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 제조하기 위한 방법으로 문헌(Sambrook, J. et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual(2판), Cold Spring Harbor Laboratory, 1. 74, 1989)에 기재된 인산칼슘법 또는 염화칼슘/염화루비듐법, 일렉트로포레이션법(electroporation), 전기주입법(electroinjection), PEG 등의 화학적 처리 방법, 유전자총(gene gun)등을 이용할 수 있다. 상기 재조합 벡터가 발현되는 형질전환체를 영양배지에서 배양하면 유용한 단백질을 대량으로 제조, 분리 가능하다. 배지와 배양조건은 숙주 세포에 따라 관용되는 것을 적당히 선택하여 이용할 수 있다. 배양 시 세포의 생육과 단백질의 대량 생산에 적합하도록 온도, 배지의 pH 및 배양시간 등의 조건들을 적절하

게 조절하여야 한다. 본 발명에 따른 재조합 벡터로 형질전환될 수 있는 숙주 세포는 원핵 세포와 진핵 세포 모두를 포함하며, DNA의 도입효율이 높고, 도입된 DNA의 발현효율이 높은 숙주가 통상 사용된다. 세균, 예를 들어 에شري키아, 슈도모나스, 바실러스, 스트렙토마이세스, 진균, 효모와 같은 주지의 진핵 및 원핵 숙주들, 스포도프테라 프루기페르다(SF9)와 같은 곤충 세포, CHO, COS 1, COS 7, BSC 1, BSC 40, BMT 10 등의 동물 세포 등이 사용될 수 있는 숙주 세포의 예이다. 바람직하게는 이. 콜라이가 사용될 수 있다

<46> 셋째, 하이브리드 펩타이드의 발현을 유도, 축적하는 단계이다. 본 발명에서는 유도인자 IPTG를 사용하여 펩타이드 발현을 유도하였고 유도시간은 단백질의 양을 최대화되게 조절하였다.

<47> 마지막으로, 하이브리드 펩타이드를 분리, 정제하는 단계이다. 일반적으로 재조합적으로 생산된 펩타이드는 배지 또는 세포 분해물로부터 회수될 수 있다. 막 결합형인 경우, 적합한 계면활성제 용액(예, 트리톤-X 100)을 사용하거나 또는 효소적 절단에 의해 막으로부터 유리될 수 있다. 하이브리드 펩타이드 발현에 사용된 세포는 동결-해동 반복, 음파처리, 기계적 파괴 또는 세포 분해제와 같은 다양한 물질적 또는 화학적 수단에 의해 파괴될 수 있으며, 통상적인 생화학 분리 기술에 의해서 분리. 정제 가능하다(Sambrook et al., Molecular Cloning: A laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Deucher, M., Guide to Protein Purification Methods Enzymology, Vol. 182. Academic Press. Inc., San Diego, CA, 1990). 전기영동, 원심분리, 겔여과,

침전, 투석, 크로마토그래피(이온교환크로마토그래피, 친화력 크로마토그래피, 면역흡착 친화력 크로마토그래피, 역상 HPLC, 겔 침투 HPLC), 등전성 포커스 및 이의 다양한 변화 및 복합 방법을 포함하나 이에 국한되지 않는다.

<48>

본 발명에서는 구체적으로 PB1₄T의 유전자 단편을 벡터 pQE30와 결합하여 이. 콜라이에 형질전환하였다. pQE30은 파아지 T5 프로모터로 구성된 프로모터와 IPTG를 유도제로 사용하는 lac 오퍼레이터 시스템을 가지고 있는, 이. 콜라이에서 단백질을 대량 생산하기에 유용한 벡터이다. PB1₄T를 인식할 수 있는 두 가지 항체, 일차 항체는 래빗(rabbit) 항-PB1₄ 다클론 항체와 마우스(mouse) 항-preS2 단클론 항체를 사용하는 웨스턴 블랏을 통하여 올바르게 발현됨을 확인하고 단백질 정제를 시작하였다. PB1₄와 PB1₄T는 불용성이므로 8M 요소로 변성시킨 후 히스티딘 태그(tag) 단백질용 Ni-NTA 수지를 이용하는 친화성 크로마토그래피를 이용하여 PB1₄와 PB1₄T를 정제하였다.

<49>

상기한 바와 같이 발현 및 정제한 폴리펩타이드를 마우스에 접종한 후 그에 따른 체중의 증가, 혈청내 항체역가, 혈청내 지질 함량의 변화를 분석하였다. 그 결과 하이브리드 폴리펩타이드로 백신화된 그룹이 대조군이나 하이브리드되지 않은 모조 펩타이드로 백신화된 그룹에 비해 체중 증가가 억제되고 모조 펩타이드에 대한 항체 역가가 높고 잔존 기간이 길며 TG 및 LDL-콜레스테롤 수치도 낮아진다는 것을 확인하였다.

<50>

펩타이드 백신 디자인에 일관적으로 적용할 수 있는 양태가 존재하지 않으며 디자인된 백신의 효능 또한 예측할 수 없다. 동일한 이유로 소수성이 매우 강한 PB1₄ 펩타이드를 이중 펩타이드인 T 세포 에피토프와 융합시킬 경우 오히려 항원성을 나타내는 부위를 분자 내부로 몰입시켜 항체 유도능이 저하될 가능성도 배제할 수 없다. 이와 같이 그 결과를 유추하기 어려운 상황에서, 본 발명자들은 아포지 단백질의 B 세포 에피토프의 모조 펩타이드에 T 세포 에피토프를 연결한 하이브리드 폴리펩타이드를 설계하고 항비만에 대한 증가된 면역원성을 입증하였다.

<51>

따라서, 또 다른 양태로서, 본 발명은 아포지단백질 B-100의 에피토프의 모조 펩타이드의 아미노산 서열을 포함하고 상기 모조 펩타이드의 C-말단과 헬퍼 T 세포의 에피토프의 N-말단이 융합된 면역원성 하이브리드 폴리펩타이드를 포함하는 비만 예방 또는 치료용 백신에 관한 것이다.

<52>

면역원이 보이는 반응의 크기와 관찰된 개체의 비율을 비교하면 우수한 효과를 보이는 백신으로 사용될 수 있는지 여부를 판단할 수 있다. 본 발명에서는 비만 예방 및 치료용 백신이라는 원래의 발명의 목적에 적합하게 (a) 체중의 증가 추이 관찰, (b) 혈청내 항체역가 관찰 및 (c) 혈청내 지질 함량의 변화를 통해 면역 반응 효과를 검정하고 항원의 우수한 형태를 입증하였다.

<53>

구체적으로, 항원 주사에 따른 체중의 변화를 7주령 SD계 흰쥐 (rat)에서 정제한 PB1₄, PB1₄T의 펩타이드를 복강에 100 μ g을 2주 간격 3회 주사한 후 체중 증가 그래프로 확인하였다(도 12). 일차 주사와 부스팅때 까지는 각 그룹별 신체 질량은

292 내지 297g으로 비슷하게 나타났지만, 2회 주사 후 1주일 후부터 백신화된 그룹이 대조군 및 모의군에서 차이가 보이기 시작하였다. 이는 최초 주사에 의해 미약한 면역반응이 2차 주사에 의해 부스팅된 후 증강된 면역응답 반응에 의해 체중증가가 억제됨을 나타내는 것이다. 대조군 및 모의군 보다는 백신 처리하였을 때 체중의 증가 정도가 감소하였으며, 또한 PB1₄ 형태의 펩타이드 보다 PB1₄T 형태의 펩타이드가 체중증가의 억제 효과가 더 우수하였다(표 2). 3차 주사 후에도 체중증가의 편차는 유지되었다. 또한, 캐리어 단백질인 오브알부민을 포함시킨 형태의 PB1₄ 보다는 균질의 키메라 항원인 PB1₄T이 면역응답 반응을 효율적으로 유도함을 확인할 수 있었다. 백신 처리된 그룹에서 SD계 흰쥐의 항체 역가는 10, 12, 14, 16주령에서 ELISA 분석하였다(도 13). PB1₄T를 주사한 그룹이 PB1₄를 주사한 그룹에 비해 항체 역가가 증가 했고 14주령에서는 PB1₄T로 백신 처리된 그룹이 PB1₄ 백신 처리된 그룹보다 O.D 수치가 1.5배 높게 나타났다. 16주령에서는 PB1₄ 그룹에서 역가의 감소가 나타났지만 PB1₄T 그룹은 역가 증가가 유지되었다. 혈청내 지질 수준은 백신 처리된 그룹이 대조군 및 모의군 보다 전체적으로 TG 및 콜레스테롤 수치가 낮게 나타났다. 특히, LDL-콜레스테롤은 정상치의 60% 수준으로 낮아졌다(도 14).

<54>

상기 결과는 B 세포 에피토프인 PB1₄만 있는 형태보다 T 세포 에피토프가 함께 융합되어 있는 형태가 면역원성이 더 높으며 효과적인 백신 조성물로 사용될 수

있음을 입증하는 것이다.

<55>

본 발명의 항비만 백신은 항원, 약제학적 허용가능한 담체, 적절한 보조제, 기타 통상적인 물질들로 구성되고 면역학적 효과량으로 투여한다. 본 발명에서 “면역학적 효과량”이란 비만 치료 및 예방효과를 나타낼 수 있을 정도의 충분한 양과 부작용이나 심각한 또는 과도한 면역반응을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며 정확한 투여 농도는 투여될 특정 면역원에 따라 달라지며 면역반응의 발생을 검사하기 위하여 당업자가 공지된 방법을 이용하여 이를 결정할 수 있다. 또한, 투여형태 및 경로, 수용자의 연령, 건강 및 체중, 증상의 특성 및 정도, 현재 치료법의 종류, 및 치료 횟수에 따라 변화될 수 있다. 담체는 당 분야에 공지된 것으로 안정화제, 희석제, 완충액을 포함한다. 적절한 안정화제는 솔비톨, 락토즈, 만니톨, 전분, 당, 텍스트란 및 포도당 같은 탄수화물; 알부민 또는 카제인 같은 단백질 등을 포함한다. 적절한 희석제에는 염, Hanks 균형 염, 링거액 등을 포함한다. 적절한 완충액에는 알칼리 금속 인산염, 알칼리 금속 탄산염, 알칼리 토금속 탄산염등을 포함한다. 또한 백신에는 면역반응을 개선 또는 강화시키기 위하여 하나 이상의 보조제 등을 포함한다. 적절한 보조제에는 펩타이드; 알루미늄 하이드록사이드; 알루미늄 포스페이트; 알루미늄 옥사이드; Marcol 52같은 미네랄 오일 또는 식물성 오일 및 하나이상의 유화제로 구성된 조성물 또는 리졸세시틴, 다가 양이온, 다가 음이온 같은 표면 활성물질 등이 포함한다. 본 발명의 백신 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 백신 조성물은 공지된 투여 경로를 통하여

투여된다. 이와 같은 방법에는 경구, 경피, 근육, 복막, 정맥, 피하, 비강 경로를 이용할 수 있지만 이에 국한되지는 않는다. 또한 제약 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

<56> 이하 실시예를 통하여 본 발명을 좀 더 구체적으로 설명한다. 이는 단지 예시하기 위한 것으로서 하기 실시예에 의해서 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

<57> 실시예

<58> 실험 재료

<59> DNA 미니프렙 키트(miniprep kit)와 겔에서 DNA를 추출하기 위하여 사용된 키트는 Nucleogen 제품을, 세포배양에 필요한 박토-트립톤(bacto-trypton), 박토-효소 추출물(bacto-yeast extract), 아가(agar) 등은 Difco사(Detroit, MI) 제품을, 제한효소는 Takara 제품을, T4 DNA 리가제는 NEB 제품을 사용하였다. 벡터는 pBluescript II SK(Stratagene사), PCR 2.1(Invitrogen, Carlsbad, CA), pQE30(Qiagen사)를, 균주는 이. 콜라이 JM109 및 M15(Qiagen사)를 사용하였다.

<60> 단백질 생성을 유도하기 위한 IPTG는 Sigma사의 것을, 발현된 단백질을 정제하기 위하여 사용된 Ni-NTA 레진은 Novagen 제품을 사용하였다. SDS-PAGE 및 웨스턴 블랏팅, ECL 등에 사용된 예비염색된 마커(prestained marker)로는 NEB사 제품을 사용하였다. 단백질을 변성 상태로 만들기 위해 사용된 요소는 Ducheфа 제품을

사용하였으며, 정제를 할 때 사용한 이미다졸은 USB 제품을 사용하였다. 투석에 사용된 막은 MWCO 3,500 Spectrum 제품을, 단백질 응집 방지를 위해 사용된 시약은 CHAPS이며 Amresco 제품을 사용하였다. ELISA에 사용된 항체는 HRP 결합된 항-흰쥐 IgG로서 Sigma 제품을 사용했다. 웨스턴 블랏과 ECL에 사용된 기질 용액으로 BCIP/NBT는 Sigma 제품을, ECL+plus 웨스턴 블랏 검출 시약은 Amersham 제품을 사용하였다. 보조제는 프로인트 애쥬번트 (Freund adjuvant; Sigma사)와 수산화알루미늄(aluminum hydroxide; Reheis사)을 사용하였다. 단백질 정량은 BCA 단백질 검사법(Pierce) 와 Bradford법 (Biorad)을 사용하였다.

<61>

혈청 내 중성 지방의 측정은 트리글리자임-브이, 총 콜레스테롤은 콜레스테라임-브이, HDL 콜레스테롤은 HDL-C555 (신양화학)를 사용했으며, LDL 콜레스테롤은 EZ LDL 콜레스테롤(Sigma)를 사용하였다. LDL 측정기는 Randox제품을 사용하였다.

<62>

SD(Sprague Dawley)계 흰쥐(rat)는 (주) 대한바이오텍에서 구입하였으며, 5주령 이상의 수컷을 사용하였다. 흰쥐의 사료는 (주) 샘타코 제품, 성분(천연 단백질 18% 이상, 조지방 5.3%, 조섬유 4.5%, 회분 8.0%)로 사육하였다.

<63>

재조합 PB1₄T 및 PB1₄ 펩타이드의 정제를 위한 초음파 분쇄 완충액은 5 mM 이미다졸, 0.5 M NaCl, 20 mM tris-Cl, pH 7.9, 결합 완충액(binding buffer)은 5 mM 이미다졸, 0.5 M NaCl, 20 mM tris-Cl, 8 M 요소, pH 7.9, 세척 완충액은 50 mM 이미다졸, 0.5 M NaCl, 20 mM tris-Cl, 8 M 요소, pH 7.9, 용출 완충액은 400 mM 이미

다졸, 0.5 M NaCl, 20 mM tris-Cl, 8 M 요소, pH 7.9로 하였다.

<64> 실시예 1: 항비만 작용 펩타이드 PB1₄T 인공유전자 작성

<65> pBluescript II SK 벡터에 들어있는 B1₄ 단편을 얻기 위해서 BamH I 과 Xho I 제한효소를 이용하여 절단하였으며, PCR 2.1 벡터에 들어있는 T 단편을 얻기 위해서 Sal I 과 HindIII 제한효소를 이용하여 절단하였다. 두 벡터로부터 얻어진 절편, B1₄와 T에 대하여, B1₄의 Xho I 점착말단과 T의 Sal I 점착 말단이 상보적이므로 T4 DNA 리가제를 이용하여 16℃에서 12시간 결합시켰으며, 그 결과 연결부위는 Sal I 이나 혹은 Xho I 에 의해 잘라지지 않게 되며, B1₄T 단편을 얻기 위하여 다시 한번 Sal I 과 HindIII로 잘랐다. 단백질을 발현하기 위하여 선택된 벡터 시스템으로 pQE30 플라스미드를 사용하였고 이 벡터는 발현시키고자 하는 단백질이 6X 히스티딘과 융합 단백질 형태로 발현되어 정제가 용이하도록 고안되었다. B1₄T 유전자 단편을 pQE30 벡터의 Sal I 및 HindIII 부위와 결합하였다. 이렇게 만들어진 클론을 pB1₄T라 명명하였다(도 1). 이. 콜라이 JM109를 형질전환시킨 후 플라스미드를 분리하여 Sal I 과 HindIII로 잘라 450 bp 단편이 삽입되었음을 확인하였다(도 2).

<66> 상기한 재조합 벡터 pB1₄T는 이. 콜라이 M15/pB1₄T의 형태로 2004년 3월 4일자 KCCM(Korean Culture Center of Microorganisms, 대한민국 서울 서대문구 홍제1동 유림빌딩 361-221)에 기탁번호 KCCM-10562로 기탁되었다.

<67> 실시예 2: 항비만 작용 펩타이드 PB1₈ 인공유전자 작성

<68> pBluescript II SK 벡터에 들어있는 B1₄ 단편을 Sal I 과 Xho I 으로 잘라서 얻었다. pBX4 벡터(B1₄ 단편이 삽입되어 있는 pQX30 벡터, 한국 특허 공개번호 제 2002-0018971호))를 Sal I 으로 잘라서 상기 B1₄ 단편과 T4 DNA 리가제로 16℃에서 밤새 결합시켰다.

<69> 실시예 3: 유전자 염기서열 결정

<70> 클로닝된 pB1₄T의 염기서열을 확인하기 위해 플라스미드 농도를 300 내지 500 ng/ μ l로 하여 (주)코아바이오시스템에 DNA 염기 서열 분석을 의뢰하였으며 올바른 클론임을 확인하였다(도 3).

<71> 실시예 4: 재조합 PB1₄T 펩타이드의 발현

<72> PB1₄T 및 PB1₈는 pQE30 벡터에서 발현하므로 벡터 자체 내에 있는 개시 코돈 으로부터 단백질 발현이 시작되고 정제를 편리하게 하기 위해서 히스티딘 6개도 같이 발현되며 엔테로키나제 부위도 포함하고 있다. 펩타이드 발현에 사용한 숙주세포는 이. 콜라이 M15로서 암피실린과 카나마이신이 함유된 LB 플레이트에 도말

(smearing)하여 클로니를 얻은 다음 Amp (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)과 Kan (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 함유된 LB 배지 10 ml에서 밤새 배양하였다. 시간 변화에 따른 단백질의 유도를 알아보기 위하여 밤새 배양한 배양액 중 1 ml를 신선한 LB 배지 50 ml에 접종했다. 본 배양액을 600nm에서 흡광도가 0.4 내지 0.5 될 때까지 37°C에서 1시간 30분 동안 진탕 배양한 후, IPTG를 최종 1 mM 농도가 되게 가하고 5시간 동안 배양을 계속하여 매 1시간 마다 1 ml씩 분취하였다. IPTG를 가하기 전에 1 ml를 미리 취하여 비 유도 대조군으로 사용하였다. 각각의 배양액은 14,000 rpm에서 1분간 원심분리 하여 펠렛을 얻은 후 2X SDS 샘플 완충액 30 μl 에 녹여 SDS-PAGE 시 샘플로 사용하였다. 이렇게 해서 계산된 단백질의 크기는 각각 PB1₄T는 16.2 kDa, PB1₈는 16.5 kDa이며 시간대 별로 샘플을 얻어 SDS-PAGE를 통해서 발현이 되는 것을 확인한 결과가 도 4 및 도 5에 나타나 있다.

<73> 실시예 5: 재조합 PB1₄T 펩타이드의 웨스턴 블랏

<74> SDS-PAGE에서 크기 분석을 통해 PB1₄T를 확인하였지만, 정확한 단백질이 발현되는지 확인하기 위하여 PB1₄T를 인식할 수 있는 2가지 항체를 사용하여 웨스턴 블랏팅을 수행하였다. PB1₄T 웨스턴 블랏의 대조군에는 M15에 pB1₄가 서브클로닝되지 않은 pQE30 벡터만을 형질전환시켜서 사용했다. 샘플은 IPTG로 유도하기 전과 유도 후 3시간 때의 것으로 하였다. 일차 항체는 래빗(rabbit) 항-PB1₄ 다클론

항체, 마우스(mouse) 항-preS2 단클론 항체를 PBS에 1:10000으로 희석하여 사용하였다. 일차 항체를 인식할 수 있는 이차 항체는 퍼옥시다제가 결합되어 있는 고트(goat) 항-래빗 IgG, 고트(goat) 항-마우스 IgG를 PBS에 1:10000으로 희석하여 사용하였다. 발색 반응은 ECL+Plus 웨스턴 블랏팅 키트를 사용하였으며 막을 카세트에 넣고 후지 의학(Fuji medical) X-선 필름을 넣은 후 10초 동안 노출하여 현상하였다. 래빗 항-PB1₄ 다클론 항체는 PB1₄T의 PB1₄ 단편을 인식하는 항체이고 마우스 항-preS2 단클론 항체는 PB1₄T의 T 단편을 인식하는 항체이므로 정확히 단백질이 발현된다면 두가지 항체를 사용한 블랏 모두에서 밴드가 나타나야 한다. 도 8에서 보여지는 바와 같이 각각의 항체가 PB1₄T의 PB1₄와 T를 인식하였으므로 PB1₄ T가 정확히 발현되었음을 확인할 수 있었다.

<75> 실시예 6: 재조합 PB1₄T 및 PB1₈ 펩타이드의 박테리아 세포 위치 확인

<76> PB1₄T 및 PB1₈의 세포 위치 확인은 IPTG 유도를 하고 나서 3시간이 지난 샘플을 원심분리를 하고 그것을 초음파 완충액으로 재현탁시킨 후 초음파를 통해서 얻은 펠렛과 상층액 각각을 SDS-PAGE로 확인하였다. 구체적으로, IPTG로 발현이 유도된 세포를 4℃, 9,000 rpm에서 30분간 원심분리를 한 후 얻어진 펠렛을 잠시 -20℃에 얼렸다가 얼음에서 녹인 후 초음파 분해 완충액을 펠렛 1 g에 대해 5 ml 비율로 넣어 재현탁하였다. 세포를 용해(lysis)시키기 위하여 30초씩 15 사이클(사이

클 사이에 1분간 휴지)로 초음파 분쇄하였다. 4°C, 9000 rpm에서 30분간 원심분리하여 상층액을 분리하여 가용성 단백질이 들어있는 가공되지 않은 추출물 A(조추출물 A)로, 남아있는 펠렛은 불용성의 단백질이 들어있는 가공되지 않은 추출물 B(조추출물 B)로 사용하였다. 각각의 샘플에 2X SDS 샘플 완충액을 섞어 95°C에서 5분간 끓인 후 SDS-PAGE를 수행하였다. 상층액 보다는 펠렛에 원하는 단백질이 많이 나타나는 것으로 보아 불용성이 강하다는 것을 확인하였다(도 6 및 도 7).

<77> 실시예 7: 재조합 PB1₄, PB1₄T 및 PB1₈의 정제

<78> 펩타이드를 정제하기 위하여 히스티딘 태그(tag) 단백질을 Ni-NTA 레진을 사용하였다. 레진에 결합되어 있는 Ni²⁺과 말단에 히스티딘 헥사머 융합 단백질이 상호작용 하는 성질을 이용하는 것으로 친화력을 이용한 친화성 크로마토그래피의 한 방법이다. 유전자 재조합된 이. 콜라이를 접종한 LB 배지 10 ml을 하룻밤 전배양한 후 500 ml의 LB 배지에 전량 접종하여 600 nm에서 흡광도 0.4 내지 0.5이 될 때까지 37°C에서 배양하였다. IPTG를 1 mM로 가하고 4시간 동안 배양한 후 9000 rpm에서 30분간 원심분리하여 세포 펠렛을 얻어 -20°C에서 두었다. 얼음에서 녹인 펠렛에 초음파 분쇄 완충액을 습윤 세포(wet cell)와 5 ml/g 비율로 넣어 재현탁시키고 초음파 분쇄를 수행하였다. 초음파 분쇄를 하여 세포를 용해시키고, 4°C, 9000 rpm에서 30분간 원심분리하여 펠렛을 얻었다. 펠렛에 결합 완충액을 남아있던 상층액의 부피와 동일하게 넣은 후 재현탁시키고 세포 잔해를 제거하기 위해서 초음

과 분쇄를 3 사이클 수행하였다. 이것을 다시 4℃, 9000 rpm에서 30분간 원심분리를 하여 얻은 상층액을 정제용 샘플로 사용하였다.

<79>

Ni-NTA 레진 충전 컬럼의 크기는 직경 1 cm, 높이 15 cm이며 레진은 2 ml, 유속(flow rate)은 2ml/min로 하였다. 레진을 컬럼에 충전한 후 3 내지 5배 부피의 증류수로 세척하고 5배 부피의 1X 하전된 완충액(50mM NiSO₄)를 흘려 주어 Ni²⁺를 결합한 후 결합 완충액으로 평형화하여 Ni-킬레이트화 친화성 수지를 제조하였다. 레진에 샘플 로딩을 2 사이클 수행하였다. 이렇게 해서 샘플 로딩이 완료되면 다시 결합 완충액으로 1.0 범위의 280 nm 흡광도에서 기저선에 도달할 때까지 흘렸다. 그 후 세척 완충액으로 10분 흘리고 평형화가 완료되면 세척 완충액에서 용출 완충액으로 이미다졸 농도 구배를 걸었고 레진에 잔류하는 단백질을 완벽하게 용출하기 위해서 용출 완충액만을 10분 더 흘렸다. 분석은 총 20개이며 각각 2 ml씩 받았다. 정제된 펩타이드는 8 M 요소 상태이고 요소를 제거하기 위해 PBS를 사용하여 밤새 투석을 수행하였다.

<80>

상기한 바와 같이, 각각의 단백질이 불용성이 강하기 때문에 정제를 할 때는 8 M 요소가 첨가된 완충액으로 단백질을 변성시킨 후 수행하였으며, 수지에 결합된 단백질을 용출하기 위해서 이미다졸을 사용하였으며 농도는 50 mM에서 400 mM로 농도 구배 방식으로 정제하였다. 그 결과가 도 9, 10, 및 11에 나타나 있다. 약 300 mM 이미다졸 농도일 때 대부분의 단백질이 용출되었다. 각각의 단백질 수율은 1 l 배양 시 PB1₈ 3 내지 3.5 mg, PB1₄T 4 내지 4.5 mg 이었다.

<81> 실시예 8: 재조합 PB1₄T 및 PB1₄, PB1₈ 펩타이드의 정량

<82> PB1₄T, PB1₄, PB1₈는 PBS에서 투석을 하게 되면 요소가 제거되므로 단백질의 응집으로 인한 침전이 발생하였으며 이 상태에서는 단백질 정량을 정확히 할 수 없었다. 정제된 단백질의 응집 상태를 제거하기 위해서 50 mM CHAPS를 사용하였다. 정량은 BCA 단백질 정량법, 브래드포드(Bradford)법을 이용하여 실시하였다. 2 mg/ml의 BSA를 1000, 500, 250, 125, 62.5 μ g/ml로 연차적 희석하여 표준으로 이용하였다. BCA 분석은 Pierce사가 제공한 프로토콜에 따라 수행하였으며 37°C에서 30분간 반응시키고 562 nm에서 흡광도를 측정하였고 브래드포드 시약은 샘플과 실온에서 10분간 반응시킨 후 595nm에서 흡광도를 측정하였으며 BSA의 연차적 희석액의 BCA 혹은 브래드포드 단백질 정량 발색 반응의 흡광도를 표준 정량선으로 이용하여 샘플의 단백질의 농도를 정량하였다.

<83> 실시예 9: PB1₄와 오브알부민의 연결

<84> PB1₄를 캐리어 단백질로서 오브알부민을 사용하여 연결하였다. 캐리어 단백질과 PB1₄의 몰비 약 1:10이 되도록 하였다. 약 1시간 동안 4°C에서 반응 바이알에서 교반하였으며, 2% 글루타르알데하이드 용액을 넣은 후, 3시간 동안 교반하고, PBS 완충액에서 MWCO 3,000 투석막으로 밤새 투석을 하여 잔여의 글루타알데하이드

를 제거하였다.

<85> 실시예 10: 백신 처리(면역화)

<86> 7주령의 SD계 흰쥐에서 6 그룹으로 나누어서 백신 처리를 수행하였다(표 1). 실시예 7에서 정제 및 정량한 펩티드 100 ug을 표 1에 나타난 바와 같이 각각의 보조제와 혼합하여 100 ul가 되도록 하여 복강에 주사하였다. 주사는 2주 간격으로 7, 9 및 11주령에 3회에 걸쳐 실시하였다. 보조제는 프로인트 애쥬번트와 수산화알루미늄미늄을 사용하였고 프로인트 애쥬번트는 펩타이드와 동일한 양으로 섞였으며 수산화알루미늄은 5.8 mg/ml을 최종 농도가 0.2 mg/ml이 되도록 농도를 조정 한 후 펩타이드와 실온에서 교반하면서 항온처리 하였다. 부스팅한 후 5일째, 최종 부스팅한 후 5일째, 2주째 및 4주째에 꼬리에서 채혈을 하였다.

【표 1】

	대조 군	모의군 (Mock)	실험군			
			A	B	C	D
항원	PBS	OVA	PB1 ₄ ^(+OVA)	PB1 ₄ T	PB1 ₄ ^(-OVA)	PB1 ₈
보조제		수산화알루 미늄	프로인트 애쥬번트 또는 수산화알루미늄	프로인트 애쥬번트 또는 수산화알루미늄	수산화알루 미늄	수산화알루 미늄

<88> 상기한 백신 처리후 체중 변화를 도 12에 그래프로 나타내었다. 처음 주사

후 부스팅할 때 까지는 각 그룹별 체중이 292 내지 297 g으로 비슷하였지만 2회 주사 후 1주일 전부터 백신 처리군과 대조군 및 모의군에서 차이를 보였다. 18주령일 때 대조군 및 모의군과 PB1₄를 주사한 그룹의 체중의 차이는 16 g, PB1₄T를 주사한 그룹과는 27 g의 차이가 나타났다(표 2). 이는 처음 주사에 의해 미약한 면역반응이 2차 주사에 의해 부스팅된 후 증강된 면역응답 반응에 의해 체중 증가가 억제됨을 나타내는 것이다. 3차 주사 후에도 체중 증가의 편차는 유지되었다.

【표 2】

연령(week)	대조군	모의군	PB1 ₄ ^{+OVA}	PB1 ₄ T
6	130 ± 0	130 ± 0	130 ± 0	130 ± 0
7 (v1)	200 ± 0	193 ± 6	202 ± 4	202 ± 4
8	253 ± 6	257 ± 6	254 ± 9	254 ± 11
9 (v2)	292 ± 8	299 ± 6	297 ± 13	303 ± 6
10	325 ± 8	328 ± 4	323 ± 12	332 ± 7
11 (v3)	354 ± 6	362 ± 3	357 ± 14	362 ± 10
12	372 ± 15	376 ± 8	365 ± 11	362 ± 13
13	395 ± 12	396 ± 12	383 ± 10	377 ± 13
14	407 ± 14	407 ± 8	395 ± 8	391 ± 12
15	413 ± 16	414 ± 9	403 ± 11	397 ± 10
16	422 ± 18	424 ± 10	414 ± 13	406 ± 10
17	436 ± 22	435 ± 11	425 ± 14	415 ± 9
18	456 ± 24	452 ± 11	436 ± 12	425 ± 9

<90>

상기 표 2에서 표준 편차는 5마리의 SD계 환위에 대해 계산된 것이며, 각각의 단위는 g으로 나타낸 것이다.

<91> 실시예 11: 항체 역가 측정

<92> 혈청 샘플을 이용하여 간접적 ELISA 방법으로 항체 역가를 측정하였다. 미세역가 평판에 PB1₄를 각 웰에 100 ng의 농도로 100 μ l씩 넣었다. 4°C에서 밤새 처리한 후 블럭킹 용액(PBS, 0.5% 카세인, 0.02% NaN₃)을 첨가하고 37°C에서 1시간 동안 항온처리하였다. PBST로 3번 씻어내고 SD계 흰쥐 백신 처리를 통해 얻은 혈청을 PBS에 1/500 내지 1/8000 배로 희석하여 100 μ l씩 사용하였고 37°C에서 1시간 동안 항온처리하였다. PBST로 3번 씻어냈으며 2차 항체로는 고트 항-흰쥐 IgG를 1/1000배로 희석했고 OPD 발색반응을 450 nm에서 흡광도에서 측정하였다.

<93> SD계 흰쥐가 10, 12, 14, 16주령일 때 백신 처리 그룹에서 흰쥐의 항체 역가를 확인한 결과가 도 13에 나타나 있다. 역가는 각각의 혈청 희석 비율을 1/2000로 하였을 때 ELISA 결과 흡광도가 0.6을 기준으로 하였다. 1/500에서 1/8000까지 희석을 통해서 PB1₄와 PB1₄T를 주사한 그룹은 14주령까지는 항체 역가가 증가를 했고 PB1₄T 그룹은 PB1₄ 보다 O.D 수치에서 1.5배 높게 나타났다. 16 주령일 때는 PB1₄ 그룹에서 역가의 감소가 나타났고 PB1₄T 그룹은 유지되었다.

<94> 실시예 12. 혈청 지질 함량의 측정

<95> TG와 총 콜레스테롤의 측정은 발색시약 200 μ l에 혈청 4 μ l를 넣고 37°C에서 5분간 항온처리한 후 각각 505 nm, 500 nm 흡광도를 측정하였다. HDL의 측정은 혈

청과 침전 시약을 1:1로 섞은 후 실온에서 10분간 방치한 후 3000 rpm 이상에서 10분간 원심 분리를 하여 얻은 상층액을 발색시약 200 μ l에 4 μ l를 넣고 37℃에서 5분간 항온처리한 후 555 nm에서 흡광도를 측정하였다. LDL 콜레스테롤의 측정은 EZ LDL 콜레스테롤 키트(Sigma 사 제품)를, LDL 캘리브레이터는 Randox사 제품을 사용하였으며, 제조사로부터 제공된 프로토콜에 따라 키트내의 시약 1 150 μ l에 혈청 4 μ l를 넣고 37℃에서 5분간 반응시킨 후 시약 2 50 μ l를 첨가하여 다시 37℃에서 5분간 반응시킨 다음 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 측정 키트에서 얻은 흡광도와 표준시액을 비교하여 농도를 계산하였다.

<96> SD계 흰쥐 3차 주사후 5주째의 혈청으로 분석한 결과가 표 3에 나타나 있다.

【표 3】

	TG	HDL-콜레스테롤	총 콜레스테롤	LDL-콜레스테롤
대조군	102.3 \pm 5.6	51.5 \pm 2.7	110.2 \pm 6.5	47.7 \pm 9.5
모의군	98.0 \pm 5.9	54.6 \pm 7.8	104.1 \pm 3.9	42.9 \pm 9.1
PB1 ₄ ^{+OVA}	92.5 \pm 4.5	41.7 \pm 4.3	94.6 \pm 7.1	34.8 \pm 4.0
PB1 ₄ T	90.3 \pm 6.2	43.0 \pm 2.5	97.6 \pm 2.3	33. \pm 4.3

<98> 상기 표 3에서 표준 편차는 5마리의 SA계 흰쥐에 대해 계산된 것이며, 각각의 단위는 mg/dl로 나타낸 것이다.

<99> 대조군 및 모의군에서는 전체적으로 TG 및 콜레스테롤 수치가 백신 처리 그

룹 보다 약 10 mg/dl(10 mg/100 ml) 높게 나타났다. 같은 백신 처리 그룹에서 TG와 LDL 콜레스테롤 수치는 PB1₄에서 높게 나왔지만 그 차이는 크지가 않았다(도 14).

【발명의 효과】

<100> 본 발명의 Apo B-100의 에피토프의 모조 펩타이드와 헬퍼 T 세포 에피토프를 융합한 면역원성 하이브리드 폴리펩타이드를 포함하는 백신 조성물은 비만의 예방 및 치료에 효과적이다.

【청구의 범위】

【청구항 1】

서열번호 1, 2 및 3중에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드의 C-말단과 헬퍼 T 세포 에피토프의 N-말단이 융합됨을 특징으로 하는 면역원성 하이브리드 폴리펩타이드.

【청구항 2】

제1항에 있어서, 펩타이드가 서열번호 1, 2 및 3중에서 선택된 아미노산 서열이 2 내지 8개 연결된 것을 특징으로 하는 폴리펩타이드.

【청구항 3】

제2항에 있어서, 펩타이드가 서열번호 1, 2 및 3중에서 선택된 아미노산 서열이 4개 연결된 것을 특징으로 하는 폴리펩타이드.

【청구항 4】

제3항에 있어서, 펩타이드가 서열번호 1의 아미노산 서열이 4개 연결된 것을 특징으로 하는 폴리펩타이드.

【청구항 5】

제4항에 있어서, 펩타이드가 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드.

【청구항 6】

제1항에 있어서, 헬퍼 T 세포 에피토프가 B형 간염 바이러스 표면 항원 헬퍼

T 세포 에피토프, 클라미디아 트라코미티스(*Chlamydia trachomatis*) 주요 외막 단백질 헬퍼 T 세포 에피토프, 플라스모디움 팔시파룸 서큘스포르조이트(*Plasmodium falciparum circumsporozoite*) 헬퍼 T 세포 에피토프, 에셰리키아 콜라이(*Escherichia coli*) TraT 헬퍼 T 세포 에피토프, 테타누스 독소이드 헬퍼 T 세포 에피토프, 디프테리아 독소이드 헬퍼 T 세포 에피토프, 쉬스토소마 만소니(*Schistosoma mansoni*) 트리오스 포스페이트 이소머라제 헬퍼 T 세포 에피토프, 홍역 바이러스 F 단백질 헬퍼 T 세포 에피토프 및 광견병 바이러스 헬퍼 T 세포 에피토프로 이루어진 그룹중에서 선택되는 폴리펩타이드.

【청구항 7】

제6항에 있어서, T 세포 에피토프가 B형 간염 바이러스 표면항원의 헬퍼 T 세포 에피토프인 폴리펩타이드.

【청구항 8】

제7항에 있어서, T 세포 에피토프가 B형 간염 바이러스 표면항원의 preS2 헬퍼 T 세포 에피토프인 폴리펩타이드.

【청구항 9】

제8항에 있어서, T 세포 에피토프가 서열번호 7의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드.

【청구항 10】

제1항에 있어서, 서열번호 9의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드.

【청구항 11】

제1항 내지 제10항중 어느 한 항의 폴리펩타이드를 포함하는 비만 예방 또는 치료용 백신.

【청구항 12】

제1항 내지 제10항중 어느 한 항의 폴리펩타이드를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

【청구항 13】

제12항에 있어서, pB1₄T(KCCM-10562)인 재조합 벡터.

【청구항 14】

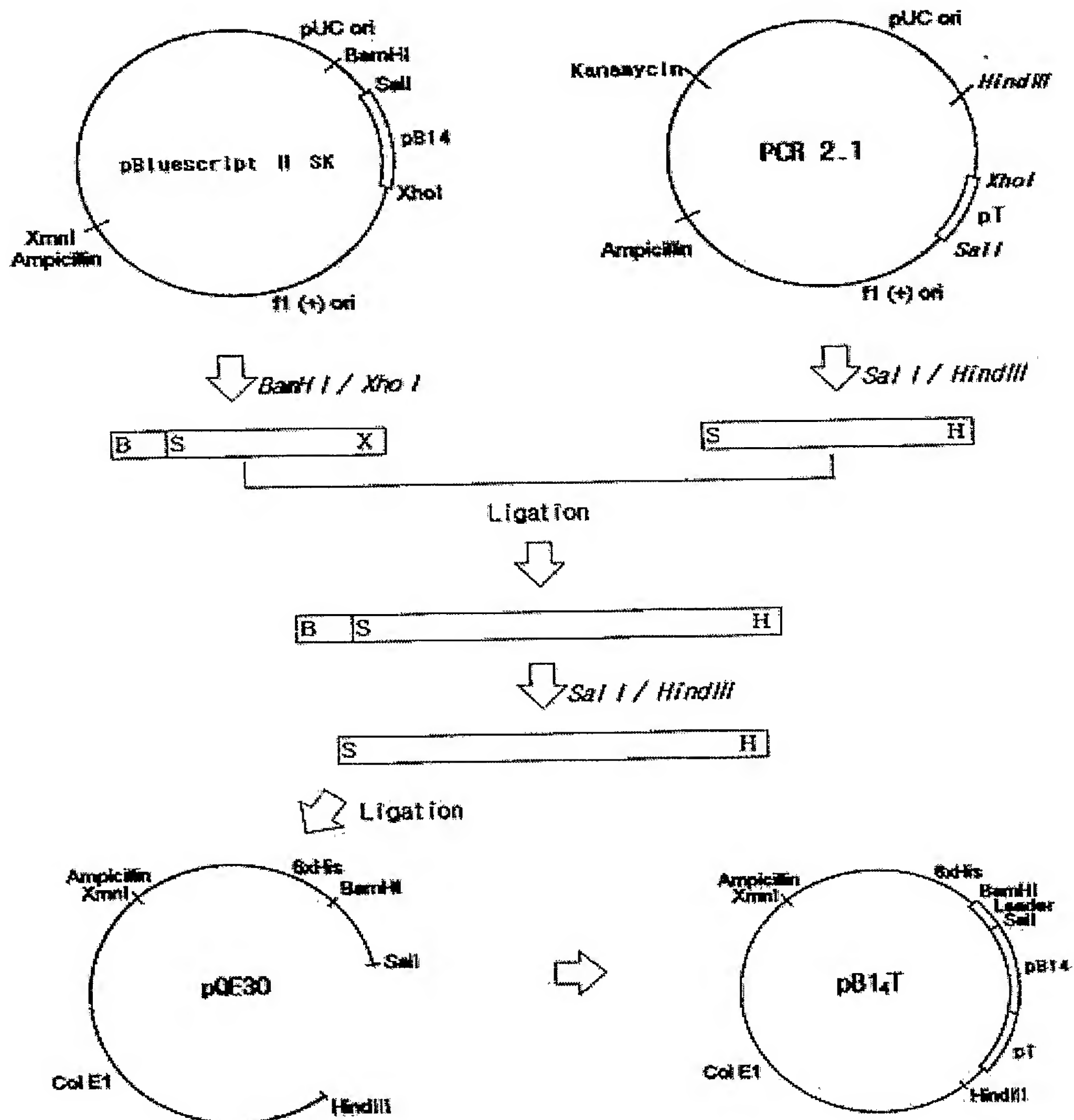
제12항의 재조합 벡터로 형질전환된 숙주 세포.

【청구항 15】

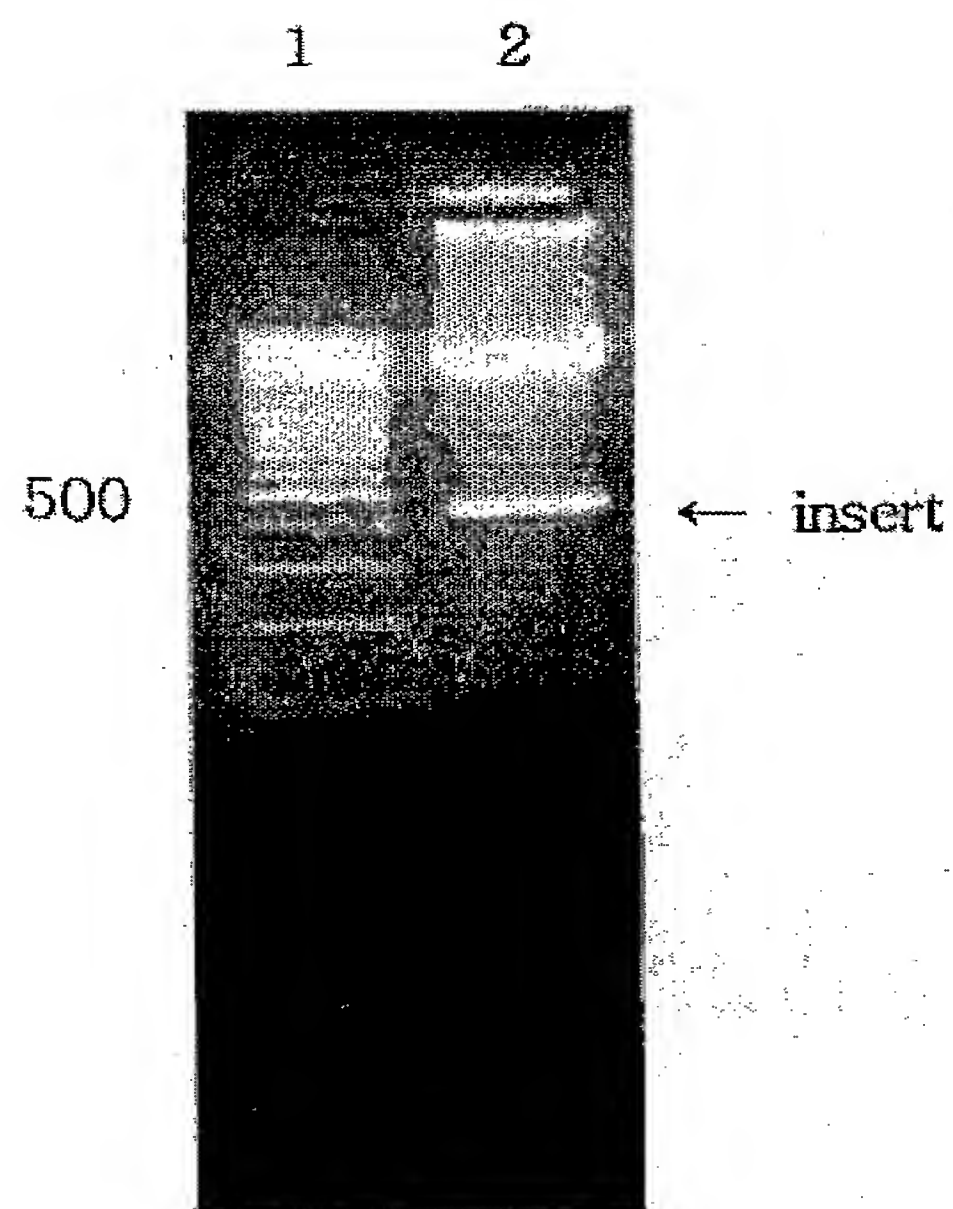
제12항의 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포를 배양하여 제1항의 폴리펩타이드를 제조하는 방법.

【도면】

【도 1】



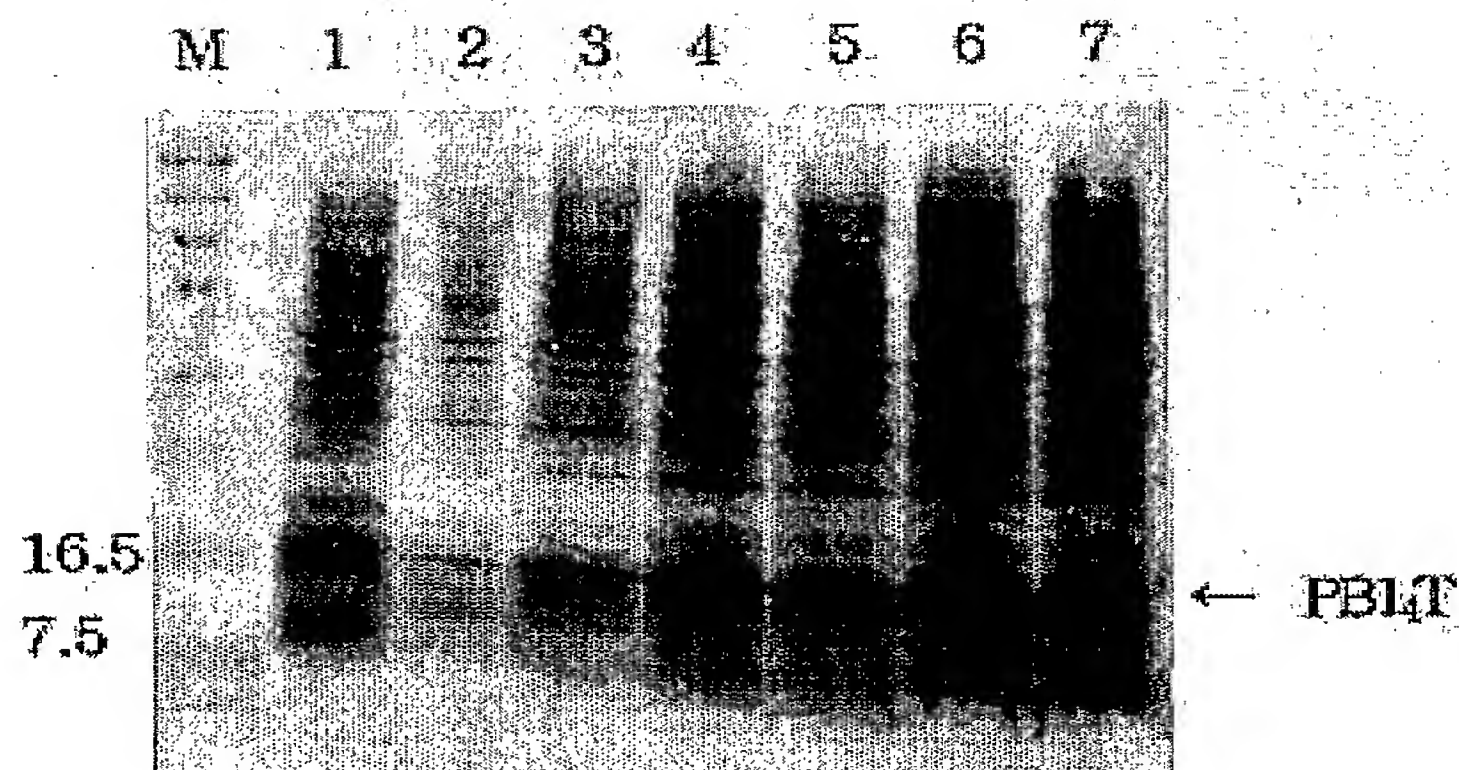
【図 2】



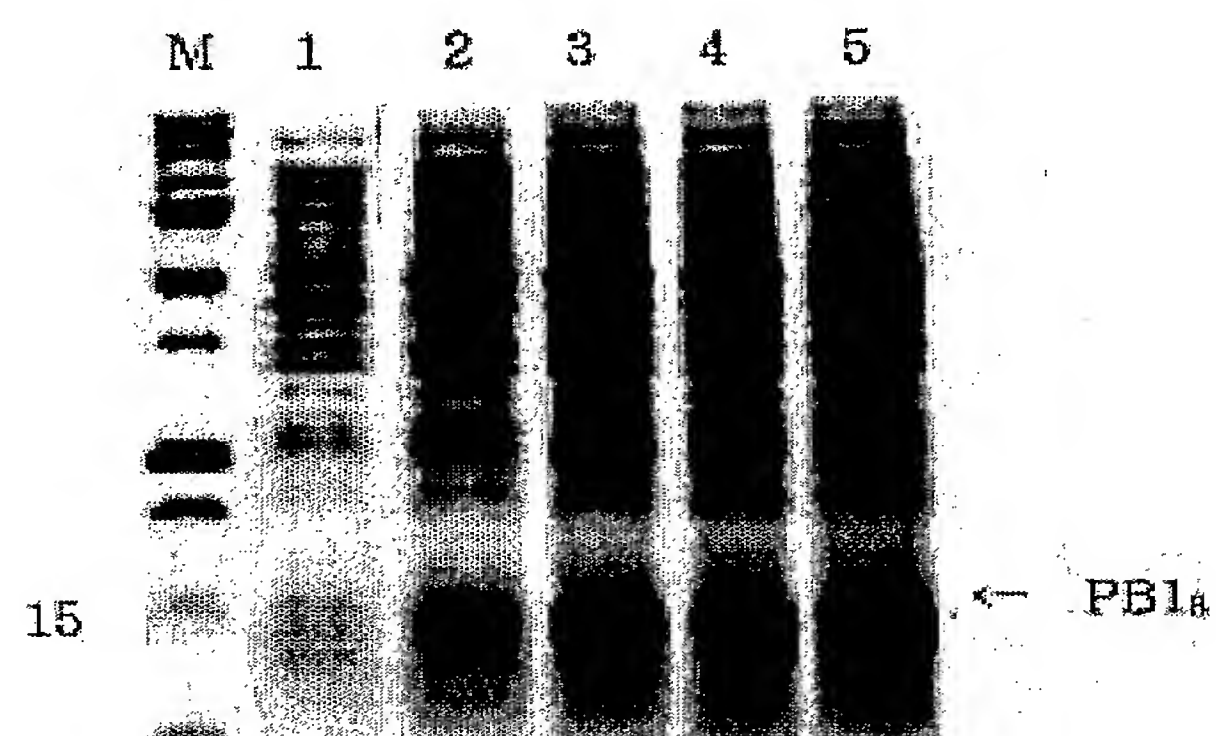
【図 3】

Start	6X His																		pB1 ₄
Met	Arg	Gly	Ser	His	His	His	His	His	His	Gly	Ser	Asp	Asp	Asp	Asp	Lys	Ile	Val	Asp
ATG	AGA	GGA	TCG	CAT	CAC	CAT	CAC	CAT	CAC	GGA	TCG	GAT	GAT	GAT	GAC	AAG	ATC	GTC	GAC
Arg	Asn	Val	Pro	Pro	Ile	Phe	Asn	Asp	Val	Tyr	Trp	Ile	Ala	Phe	Leu	Asp	Arg	Asn	Val
CGT	AAT	GTT	CCT	CCT	ATC	TTC	AAT	GAT	GTT	TAT	TGG	ATT	GCA	TTC	CTC	GAC	CGT	AAT	GTT
Pro	Pro	Ile	Phe	Asn	Asp	Val	Tyr	Trp	Ile	Ala	Phe	Leu	Asp	Arg	Asn	Val	Pro	Pro	Ile
CCT	CCT	ATC	TTC	AAT	GAT	GTT	TAT	TGG	ATT	GCA	TTC	CTC	GAC	CGT	AAT	GTT	CCT	CCT	ATC
Phe	Asn	Asp	Val	Tyr	Trp	Ile	Ala	Phe	Leu	Asp	Arg	Asn	Val	Pro	Pro	Ile	Phe	Asn	Asp
TTC	AAT	GAT	GTT	TAT	TGG	ATT	GCA	TTC	CTC	GAC	CGT	AAT	GTT	CCT	CCT	ATC	TTC	AAT	GAT
Val	Tyr	Trp	Ile	Ala	Phe	Leu	Asp	Met	Gln	Trp	Asn	Ser	Thr	Thr	Phe	His	Gln	Ala	Leu
GTT	TAT	TGG	ATT	GCA	TTC	CTC	GAC	ATG	CAG	TGG	AAG	TCC	ACC	ACA	TTC	CAC	CAA	GCT	CTG
Leu	Asp	Pro	Arg	Val	Arg	Gly	Leu	Tyr	Phe	Pro	Ala	Gly	Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	Thr	Val
GTA	GAT	CCC	AGA	GTG	AGG	GGC	CTA	TAT	TTT	CCT	GCT	GGT	GGC	TCC	AGT	TCC	GGA	ACA	GTA
Asn	Pro	Val	Pro	Thr	Thr	Ala	Ser	Pro	Ile	Ser	Ser	Ile	Phe	Ser	Arg	Thr	Gly	Asp	Pro
AAC	CCT	GTT	CCG	ACT	ACT	GCC	TCA	CCC	ATA	TGG	TCA	ATC	TTC	TGG	AGG	ACT	GGG	GAC	CCT
Ala	Pro	Asn	Leu	Glu	Arg	Ser	Stop												
GCA	CCG	AAC	CTC	GAG	CGG	TCA	TAA	GCC	GAA	TTC	CAG	CAC	ACT	GGC	GGC	CGT	TAC	TAG	TGG
ATC CGA GGT CGG TAG CAA GCT																			

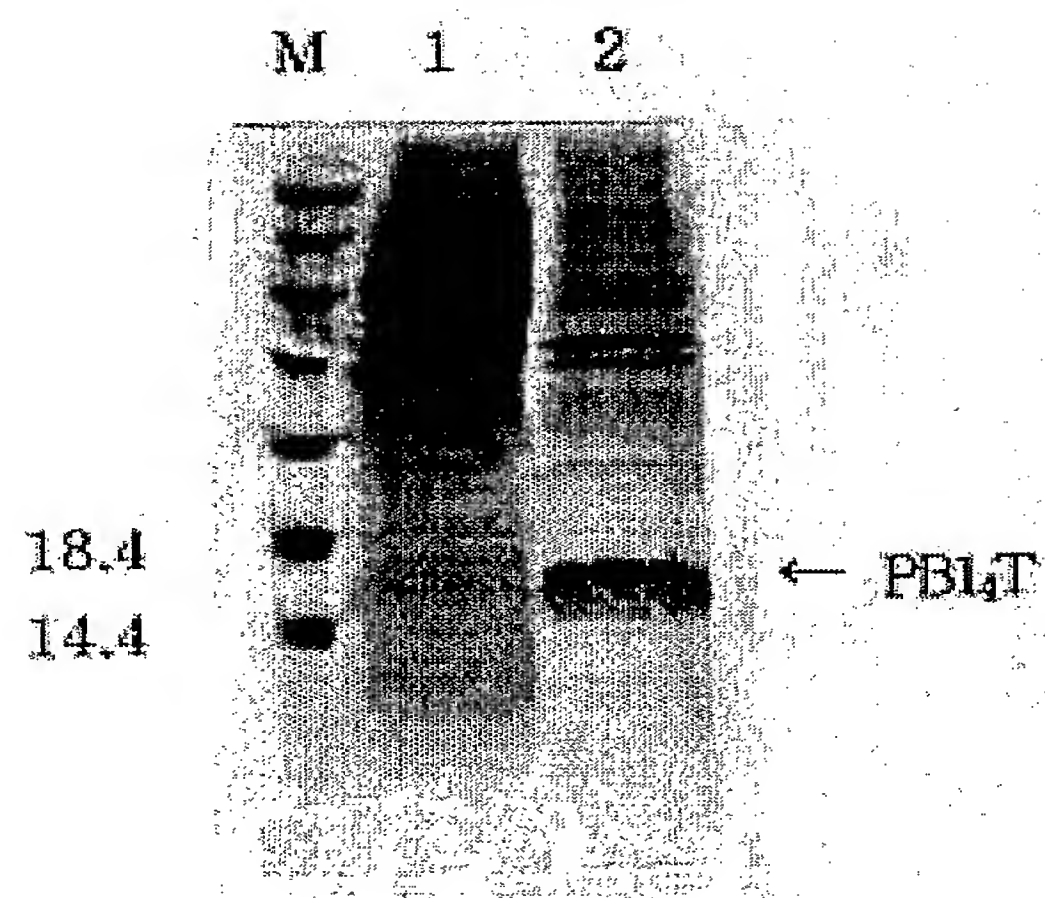
【図 4】



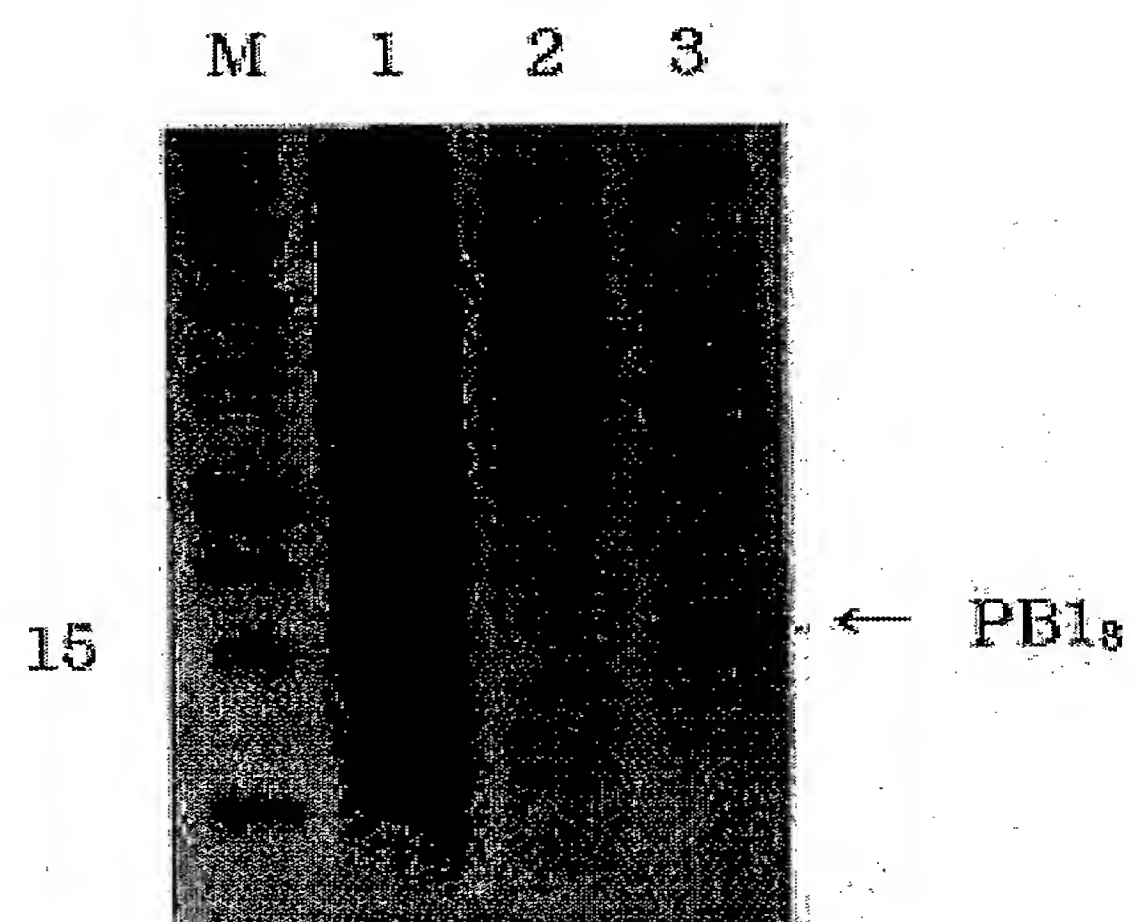
【図 5】



【図 6】

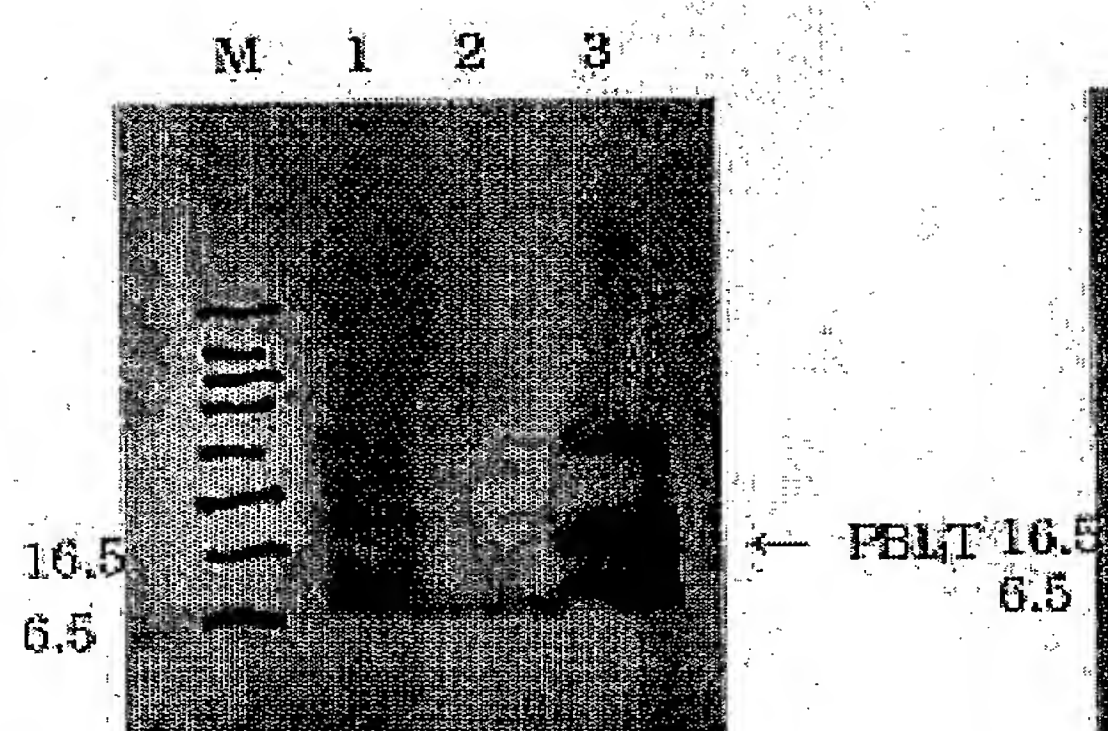


【図 7】

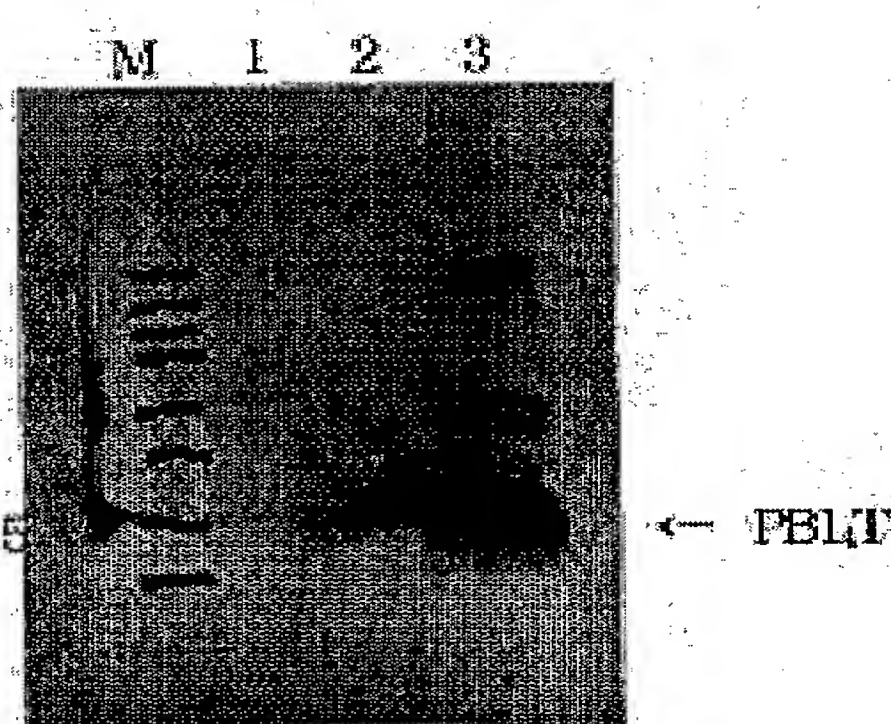


【図 8】

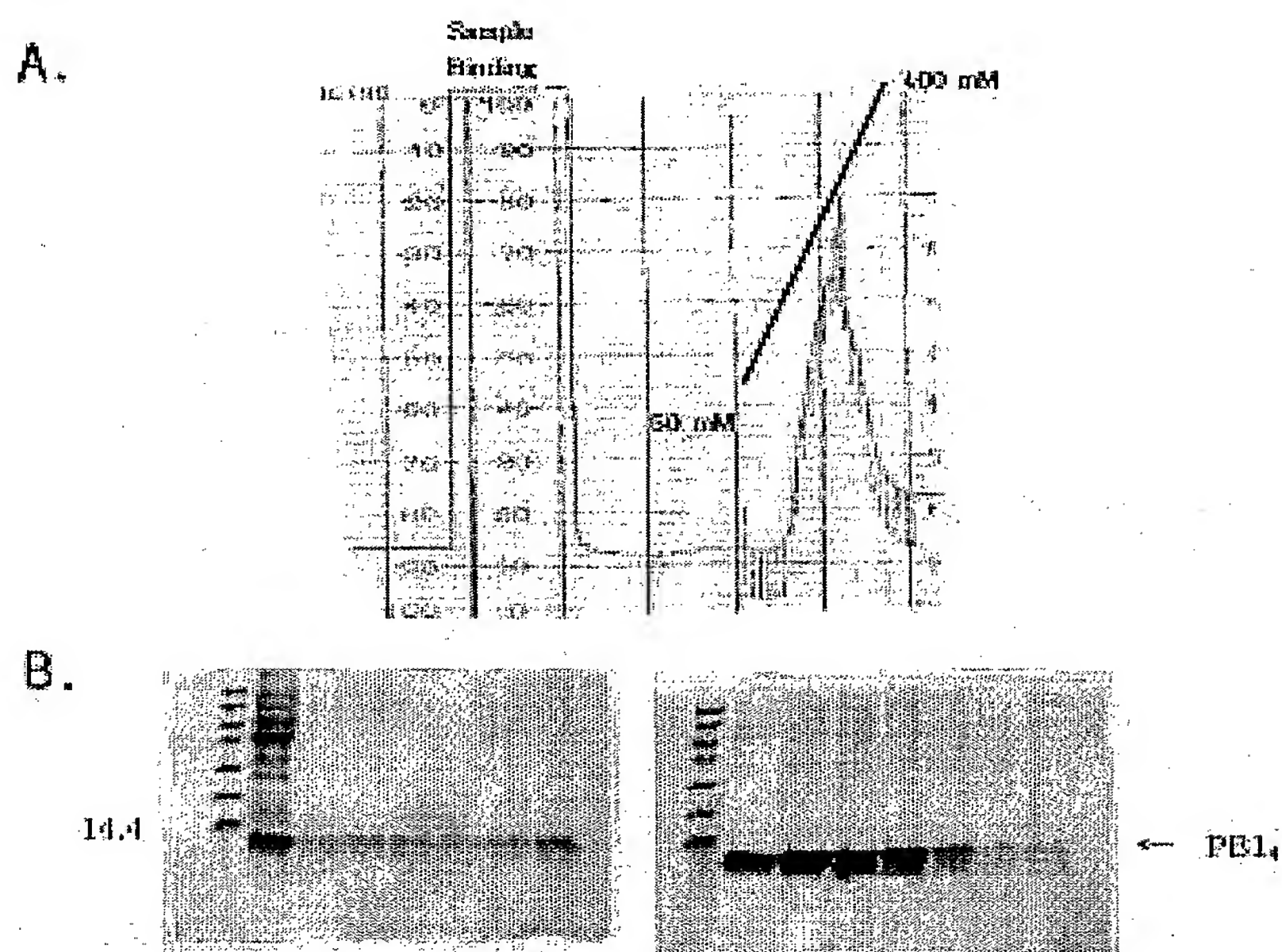
A.



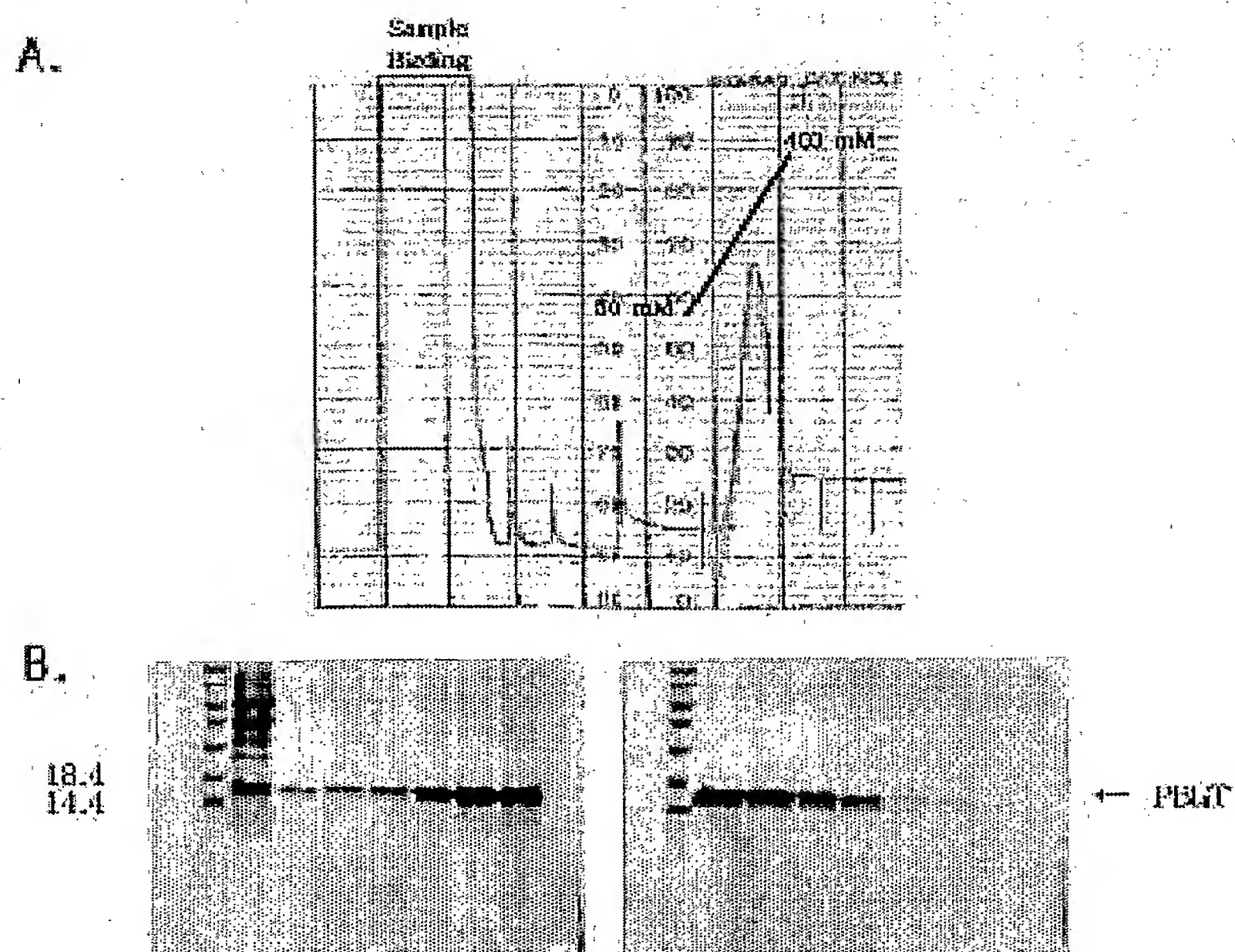
B.



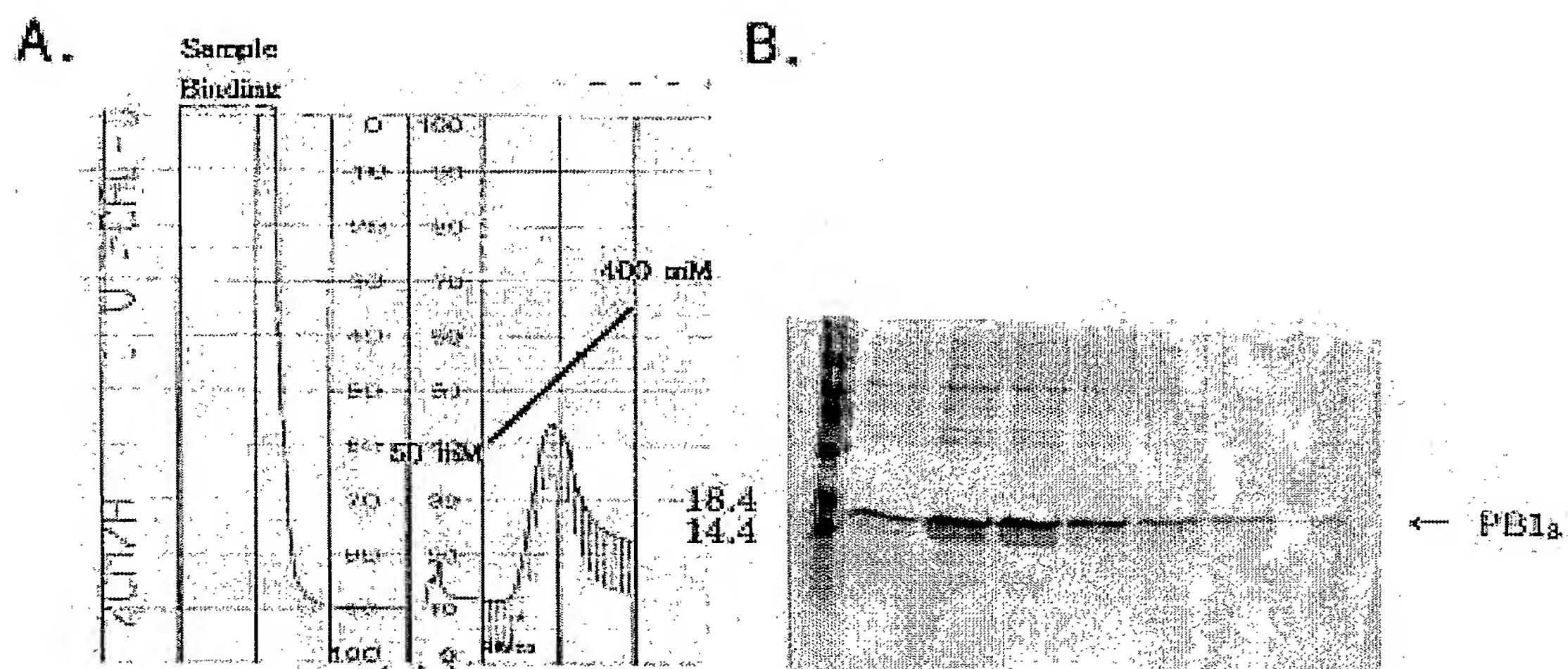
【図 9】



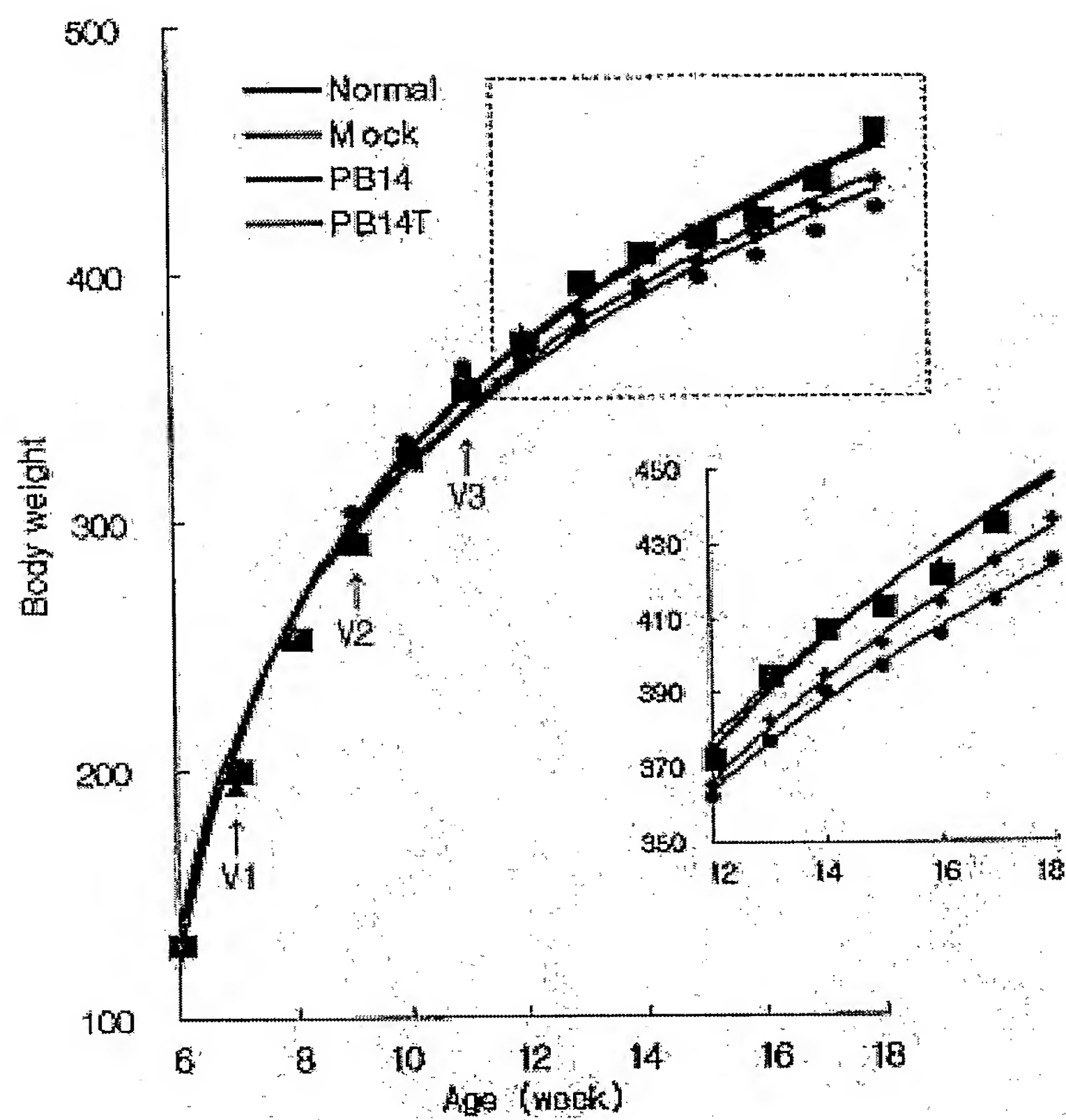
【図 10】



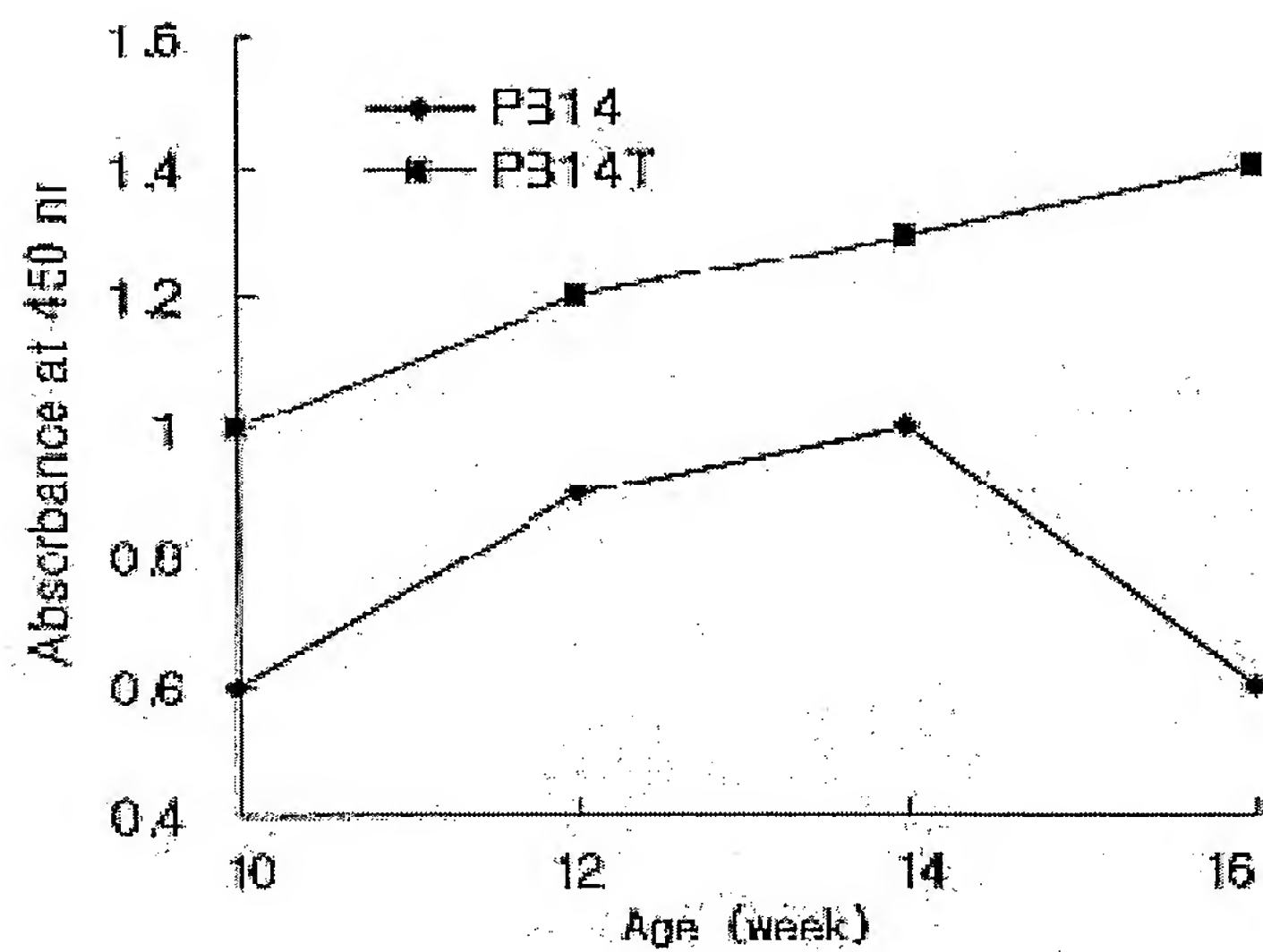
【図 11】



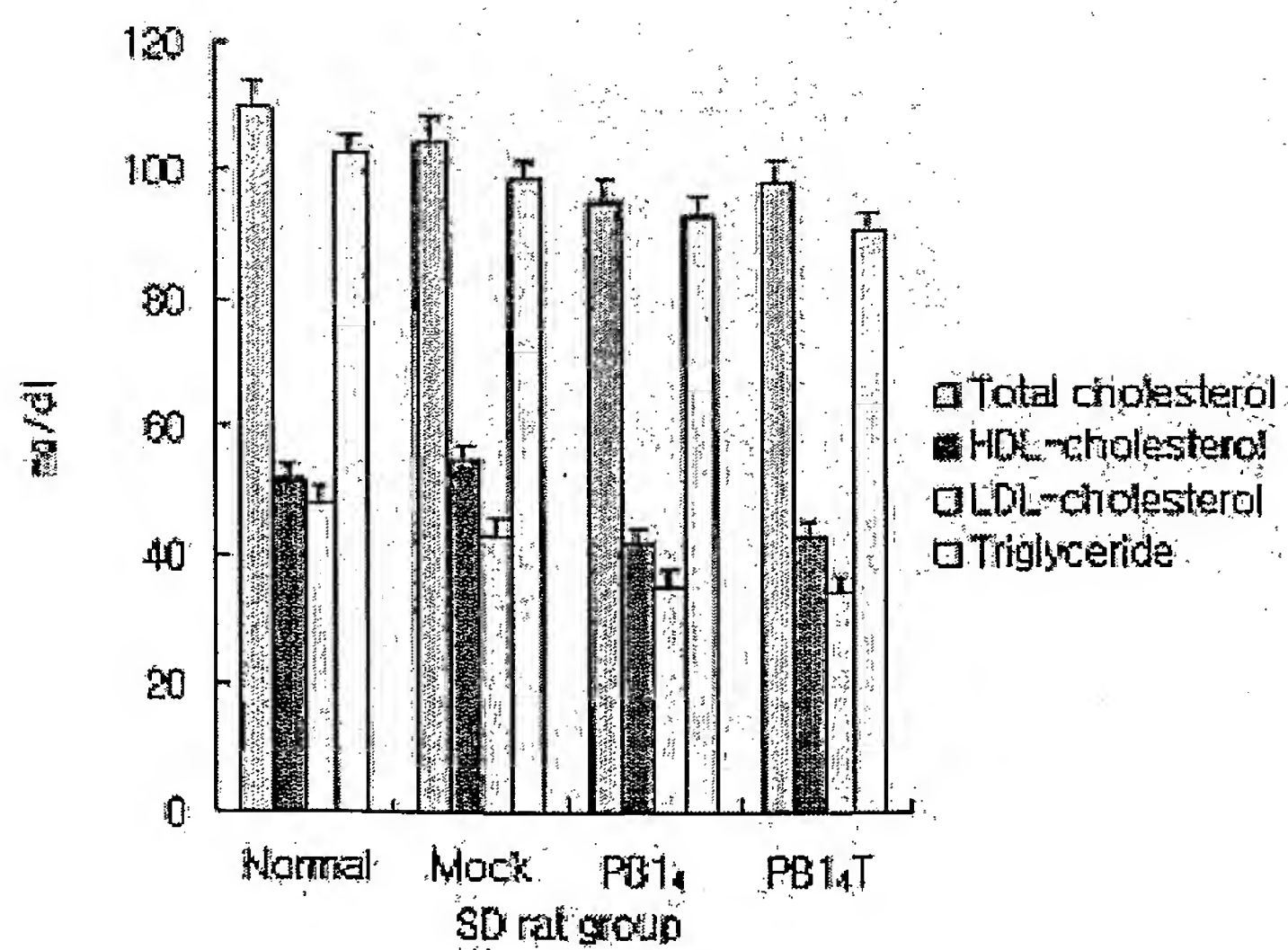
【図 12】



【도 13】



【도 14】



【서열목록】

<110> SJ BIOMED INC.

<120> Anti-obese immunogenic hybrid polypeptides and anti-obese vaccine

composition comprising the same

<160> 9

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> mimetic peptide for apolipoprotein B-100 epitope

<400> 1

Arg Asn Val Pro Pro Ile Phe Asn Asp Val Tyr Trp Ile Ala Phe

1 5 10 15

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mimetic peptide for apolipoprotein B-100 epitope

<400> 2

Arg Phe Arg Gly Leu Ile Ser Leu Ser Gln Val Tyr Leu Asp Pro

1 5 10 15

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mimetic peptide for apolipoprotein B-100 epitope

<400> 3

Ser Val Cys Gly Cys Pro Val Gly His His Asp Val Val Gly Leu

1 5 10 15

<210> 4

<211> 204

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA sequence for terameric mimetic peptide

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(204)

<400> 4

gtc gac cgt aat gtt cct cct atc ttc aat gat gtt tat tgg att gca 48

Val Asp Arg Asn Val Pro Pro Ile Phe Asn Asp Val Tyr Trp Ile Ala

1 5 10 15

ttc ctc gac cgt aat gtt cct cct atc ttc aat gat gtt tat tgg att 96

Phe Leu Asp Arg Asn Val Pro Pro Ile Phe Asn Asp Val Tyr Trp Ile

20 25 30

gca ttc ctc gac cgt aat gtt cct cct atc ttc aat gat gtt tat tgg 144

Ala Phe Leu Asp Arg Asn Val Pro Pro Ile Phe Asn Asp Val Tyr Trp

35 40 45

att gca ttc ctc gac cgt aat gtt cct cct atc ttc aat gat gtt tat 192

Ile Ala Phe Leu Asp Arg Asn Val Pro Pro Ile Phe Asn Asp Val Tyr

50 55 60

tgg att gca ttc 204

Trp Ile Ala Phe

65

<210> 5

<211> 68

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 5

Val Asp Arg Asn Val Pro Pro Ile Phe Asn Asp Val Tyr Trp Ile Ala

1 5 10 15

Phe Leu Asp Arg Asn Val Pro Pro Ile Phe Asn Asp Val Tyr Trp Ile

20 25 30

Ala Phe Leu Asp Arg Asn Val Pro Pro Ile Phe Asn Asp Val Tyr Trp

35 40 45

Ile Ala Phe Leu Asp Arg Asn Val Pro Pro Ile Phe Asn Asp Val Tyr

50 55 60

Trp Ile Ala Phe

65

<210> 6

<211> 180

<212> DNA

<213> Hepatitis B virus

<220>

<221> CDS
 <222> (1)..(177)
 <223> Hepatitis B virus preS2
 <220>
 <221> terminator
 <222> (178)..(180)
 <400> 6
 atg cag tgg aac tcc acc aca ttc cac caa gct ctg cta gat ccc aga 48
 Met Gln Trp Asn Ser Thr Thr Phe His Gln Ala Leu Leu Asp Pro Arg
 1 5 10 15
 gtg agg ggc cta tat ttt cct gct ggt ggc tcc agt tcc gga aca gta 96
 Val Arg Gly Leu Tyr Phe Pro Ala Gly Gly Ser Ser Ser Gly Thr Val
 20 25 30
 aac cct gtt ccg act act gcc tca ccc ata tcg tca atc ttc tcg agg 144
 Asn Pro Val Pro Thr Thr Ala Ser Pro Ile Ser Ser Ile Phe Ser Arg
 35 40 45
 act ggg gac cct gca ccg aac ctc gag cgg tca taa 180
 Thr Gly Asp Pro Ala Pro Asn Leu Glu Arg Ser
 50 55

<210> 7
 <211> 59
 <212> PRT
 <213> Hepatitis B virus
 <400> 7
 Met Gln Trp Asn Ser Thr Thr Phe His Gln Ala Leu Leu Asp Pro Arg
 1 5 10 15
 Val Arg Gly Leu Tyr Phe Pro Ala Gly Gly Ser Ser Ser Gly Thr Val
 20 25 30
 Asn Pro Val Pro Thr Thr Ala Ser Pro Ile Ser Ser Ile Phe Ser Arg
 35 40 45
 Thr Gly Asp Pro Ala Pro Asn Leu Glu Arg Ser
 50 55

<210> 8
 <211> 444
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>

<223> DNA sequence for hybride polypeptide

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(441)

<220>

<221> terminator

<222> (441)..(444)

<400> 8

atg aga gga tcg cat cac cat cac cat cac gga tcc gat gat gat gac 48

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Ser Asp Asp Asp Asp

1 5 10 15

aag atc gtc gac cgt aat gtt cct cct atc ttc aat gat gtt tat tgg 96

Lys Ile Val Asp Arg Asn Val Pro Pro Ile Phe Asn Asp Val Tyr Trp

20 25 30

att gca ttc ctc gac cgt aat gtt cct cct atc ttc aat gat gtt tat 144

Ile Ala Phe Leu Asp Arg Asn Val Pro Pro Ile Phe Asn Asp Val Tyr

35 40 45

tgg att gca ttc ctc gac cgt aat gtt cct cct atc ttc aat gat gtt 192

Trp Ile Ala Phe Leu Asp Arg Asn Val Pro Pro Ile Phe Asn Asp Val

50 55 60

tat tgg att gca ttc ctc gac cgt aat gtt cct cct atc ttc aat gat 240

Tyr Trp Ile Ala Phe Leu Asp Arg Asn Val Pro Pro Ile Phe Asn Asp

65 70 75 80

gtt tat tgg att gca ttc ctc gac atg cag tgg aac tcc acc aca ttc 288

Val Tyr Trp Ile Ala Phe Leu Asp Met Gln Trp Asn Ser Thr Thr Phe

85 90 95

cac caa gct ctg cta gat ccc aga gtg agg ggc cta tat ttt cct gct 336

His Gln Ala Leu Leu Asp Pro Arg Val Arg Gly Leu Tyr Phe Pro Ala

100 105 110

ggt ggc tcc agt tcc gga aca gta aac cct gtt ccg act act gcc tca 384

Gly Gly Ser Ser Ser Gly Thr Val Asn Pro Val Pro Thr Thr Ala Ser

115 120 125

ccc ata tcg tca atc ttc tcg agg act ggg gac cct gca ccg aac ctc 432

Pro Ile Ser Ser Ile Phe Ser Arg Thr Gly Asp Pro Ala Pro Asn Leu

130 135 140

gag cgg tca taa 444

Glu Arg Ser

145

<210> 9

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 9

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Ser Asp Asp Asp Asp

1 5 10 15

Lys Ile Val Asp Arg Asn Val Pro Pro Ile Phe Asn Asp Val Tyr Trp

20 25 30

Ile Ala Phe Leu Asp Arg Asn Val Pro Pro Ile Phe Asn Asp Val Tyr

35 40 45

Trp Ile Ala Phe Leu Asp Arg Asn Val Pro Pro Ile Phe Asn Asp Val

50 55 60

Tyr Trp Ile Ala Phe Leu Asp Arg Asn Val Pro Pro Ile Phe Asn Asp

65 70 75 80

Val Tyr Trp Ile Ala Phe Leu Asp Met Gln Trp Asn Ser Thr Thr Phe

85 90 95

His Gln Ala Leu Leu Asp Pro Arg Val Arg Gly Leu Tyr Phe Pro Ala

100 105 110

Gly Gly Ser Ser Ser Gly Thr Val Asn Pro Val Pro Thr Thr Ala Ser

115 120 125

Pro Ile Ser Ser Ile Phe Ser Arg Thr Gly Asp Pro Ala Pro Asn Leu

130 135 140

Glu Arg Ser

145

